

중간엽 줄기세포의 골아세포 분화에 있어 STAT의 발현 및 역할

연세대학교 BK21의과학사업단¹⁾, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실²⁾황지숙^{1,2)}, 이경미^{1,2)}, 정호선²⁾, 이진우^{1,2)}, 최윤락²⁾

= Abstract =

Differential Expression of STATs and Its Function in Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells**Ji Suk Hwang, M.D.^{1,2)}, Kyung Mi Lee, M.D.^{1,2)}, Ho Sun Jung, M.D.²⁾
Jin Woo Lee, M.D.^{1,2)}, Yun Rak Choi, M.D.²⁾***Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University, Seoul, Korea¹⁾
Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea²⁾***Purpose:** To investigate the role of STAT5 during osteogenesis differentiation of human mesenchymal stem cells(hMSC).**Materials and Methods:** To assess the expression pattern of STATs during osteogenic differentiation, we performed western blot analysis and RT-PCR. By RNA interference, we have performed effect of STAT5A and STAT5B in osteogenesis. As a result of Luciferase assay, the promoter activity of DLX5 was decreased by STAT5A.**Results:** To assess the expression pattern of STATs during osteogenic differentiation, we have performed western blot and RT-PCR after 14 day differentiation period. STAT1, 2, 3 and 4 showed no change in expression level during differentiation, while STAT5A and STAT5B displayed steady increase compared to the control. When STAT5A was knock down, the level of osteogenesis was increased. The transcriptional activity of DLX5 was decreased about 70% by STAT5A.**Conclusion:** The expression of STAT5A and STAT5B increased during osteogenesis of hMSC. Also, we shown that STAT5A regulated the transcriptional activity of DLX5. These results indicate that STAT5A acts as a pivotal transcription factor in osteogenesis of hMSC.**Key Words:** Mesenchymal stem cells, Osteogenesis, STAT5A, STAT5B, DLX5

※ 통신저자: 최 윤 락

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL: 02) 2228-2183 FAX: 02) 363-1139 E-mail: YRCHOI@yuhs.ac

투고일: 2012년 12월 11일

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2009년도 신진교수연구비(과제번호: 6-2009-0181)의 지원으로 이루어졌음.

서 론

골수유래 중간엽 줄기세포(Bone marrow derived mesenchymal stem cells)는 다양한 세포로 분화하며, 자가 재생을 하는 줄기세포이며, 골아세포, 지방세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화가 가능하다^{2,5,7,13)}. 또한 중간엽 줄기세포는 골아세포, 지방세포, 연골세포의 상호 교차분화가 가능하다^{5,15)}. 따라서 중간엽 줄기세포는 특정 질병치료를 목적으로 하는 세포 치료제로써 중요한 세포원이다. 중간엽 줄기세포에 의한 골아세포와 지방세포의 균형조절은 골 질환에 영향을 준다. 예를 들면 노화에 의한 골다공증에서 골 형성의 감소는 지방세포와 골아세포의 불균형으로 인해 발생할 수 있으며, 골아세포가 줄어든 곳에 지방세포가 채워짐으로써 질병을 더욱 악화시킨다⁹⁾. 따라서 골질환 치료를 위해 중간엽 줄기세포의 골아세포와 지방세포로의 균형된 분화기전에 대한 연구가 필요하다.

중간엽 줄기세포의 골아세포 분화에는 다양한 전사인자와 유전자들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 골아세포로의 분화에서 중요한 조절유전자는 Cbfa1/Runx2 (core binding factor alpha1/runt related transcription factor2)와 Osterix가 잘 알려져 있고, LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein⁴⁾신호전달 경로는 골아세포 증식을 조절한다^{7,14)}. 중간엽 줄

기세포에서 Runx2의 발현은 골아세포로 발생할 수 있는 골전구세포를 유도한다⁷⁾. 이런 골전구세포는 Sox9이 연골세포로 분화를 유도하고, Runx2, Osterix가 골아세포로의 분화를 유도한다¹²⁾. Runx2 knockout 마우스와 Osterix knockout 마우스에서는 골아세포의 결핍으로 인해 막내골화, 연골내골화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 또 다른 중요한 전사인자인 DLX5 (distal-less homeobox5)는 분화유도 전사인자로서 골아세포 분화말기에 관여한다¹³⁾. DLX5 knockout 마우스에서는 두개골화 지연과 비이상적인 골 형성으로 인한 심각한 두개안면 이상이 확인되었다. 또한 DLX5는 BMP-2신호전달 경로에서 Runx2와 Osterix의 상위 유전자로 알려져 있다.

DLX5와 MSX2 (msh homeobox2)는 골아세포 분화과정 중 반대역할을 하고 있다. DLX5는 Osteoclastin과 비슷한 분화말기에 발현을 하고, 골아세포로의 분화유도를 활성화 시킨다. 반면 MSX2는 분화초기에 발현을 하여 세포증식을 활성화하고, 골아세포 분화말기로의 진행을 억제한다^{6,12,18)}.

STAT (signal transducers and activators of transcription)은 7개의 종류(STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6)로 구성되어 있다. 이들은 동형접합체나 이형접합체를 이룬 후, 다양한 수용체

Table 1. Primer sequences for reverse transcription-PCR

Gene	Strand	Primer Sequence
GAPDH	S	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'
	AS	5' GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3'
STAT5A	S	5' CGAGTGCAGTGGTGAGATCC 3'
	AS	5' AACACAAGCTCATTGCTGCC 3'
STAT5B	S	5' CAGCCTGGACGTGCTACAGT 3'
	AS	5' TGGTCACCAGGGCTGAGATA 3'
ALP	S	5' CTACCAGCTCATGCATAACA 3'
	AS	5' GACCCAATAGGTAGTCCACA 3'
DLX5	S	5' GACAGGATCCCTATGACAGGAGTGTGTTGAC 3'
	AS	5' TGGACTCGAGATCTAATAAAGCGTCCCCGGA 3'
MSX2	S	5' GCCAAGACATATGAGCCCTACCACCTG 3'
	AS	5' GGACAGGTGGTACATGCCATATCCCAC3'

S: Sense Strand AS: Antisense Strand

나 사이토카인에 의해 인산화되고 핵 내로 이동한 후 특정 유전자에 결합하여 유전자의 발현을 조절한다^{1,4,8,15,21}). STAT1은 골아세포 분화기간 동안 세포질에서 Runx2의 발현을 억제시킨다고 하며 STAT1 knockout 마우스에서는 골아세포가 재생되고, 골수에서 석회화가 증가되었다¹³). 하지만 아직까지 STATs과 골아 세포분화와의 관계에 대한 연구는 미미하다.

이에 본 연구에서는 중간엽 줄기세포에서 STAT 및 골분화 특이 유전자의 발현이 골아세포 분화과정 동안 어떻게 조절되는지 살펴보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 중간엽 줄기세포 배양 및 골아세포로의 분화 유도

성인 공여자의 장골로부터 얻은 골수 조직으로부터 성인 중간엽 줄기세포를 분리한 후 기본 배양액(10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbecco's modified eagles medium-low glucose (DMEM-LG))에서 일차 배양을 한 뒤 75 cm² 세포 배양플라스크 90% 이상이 차게 되면 계대 배양하였다. 세포 배양액은 3일에 한 번씩 갈아주었다. 1차 배양된 중간엽 줄기세포 1,000개를 10 cm²배양 용기에 7일 동안 배양한 후, 2×10⁵ cells/well로 6 well 배양 용기에 계대 배양하여 골아세포 분화 배양액(10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 100 nM dexamethasone, 10 mM β-glycerophosphate, 50 ug/ml ascorbic acid를 첨가한 DMEM-LG)을 첨가하여 14일 간 분화유도 하였다.

2. Western blot analysis

골아세포에서의 STATs 발현을 관찰하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 중간엽 줄기세포를 14일 동안 골아세포로 분화유도 후, 1X whole cell lysis buffer (1%SDS, 60 mMTris-Cl (pH6.8))로 단백질 추출물을 준비하였다. 10% SDS-PAGE mini-gel에 단백질

30 μg씩 주고, SDS running buffer에서 80 V로 전기영동을 2시간 30분 동안 진행하였다. 1X transfer buffer에서 50 V로 2시간 동안 transfer한 후, membrane을 5% 무지방 우유를 함유한 TBST (100mM Tris (pH7.5), 1.5 M NaCl, 0.5% Tween-20) 용액으로 1시간 동안 blocking을 하였다. 1차 항체를 1% 무지방 우유를 함유한 TBST로 실온에서 2시간 동안 부착시켰다. ECL western blotting detection kit (Amershampharmacia, Vineland, NJ, USA)를 이용하여 X-ray필름에서 현상하였다.

3. RNA추출과 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 mRNA상에서의 STATs과 골아세포와 관련된 유전자의 발현을 분석하였다. RNeasy Mini Kit (Qiagene, Hilden, Germany)를 사용하여 cDNA합성에 사용될 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA를 Ominiscript RT Kit (Qiagene, Hilden, Germany)를 사용하고, 37°C에서 90분, 95°C에서 5분 동안 반응하여 cDNA로 합성하였다. cDNA를 Taq DNA polymerase kit (Qiagene, Hilden, Germany), 10 mM dNTP 혼합액과 10 pM의 특정 프라이머 (CosmogeneTeq, Seoul, Korea)를 첨가하여 중합효소 연쇄 반응법을 시행하였다 (Table 1). 중합효소 연쇄반응 결과물은 1.5% agarose gel에서 25분 동안 전기영동을 시행한 후, UV transilluminator로 관찰하였다.

4. RNA interference

중간엽 줄기세포를 6 well plate에 1.5×10⁵ cell/ml로 분주 후 siSTAT5A, siSTAT5B를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 형질주입을 하였다. 24시간 후, 배지를 골아세포 분화 배지로 갈아주고 14일 동안 골아세포분화를 유도하였다.

5. Luciferase reporter assay

Hela세포를 6 well plate에서 배양한 후, Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 형질주입을 하였다. 형질주입 시 700 ng luciferase reporter vector, 300 ng overexpression vector를 사용하였다. 48시간 후 1x passive lysis buffer를 이용해 단백질을 추출하였다. Dual luciferase substrate (Promega, Madison, IL, USA)를 이용하여 Luciferase 활성을 측정하였다. 이 실험은 3회 반복 하였다. 리포터벡터는 pGL3B human STAT5A -2121/+88, pGL3B human MSX2 -1969/+428, pGL3B human Osterix -1990/+128, pGL3B human DLX5 -2000/+340를 사용하였다.

5. Von kossa염색법

Von Kossa 염색법을 이용하여 골아세포로 유도가 되었는지 확인하였다. Acetone: methanol=1:1을 이용하여 세포를 고정을 하였고, 3% silver nitrate solution (Sigma, ST. Louis, MO, USA)로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 30분 동

안 빛에 노출시켰다.

결 과

1. 중간엽 줄기세포의 골아세포 분화 과정 중 STATs 유전자의 발현변화

중간엽 줄기세포를 기본 배양액에서 배양한 후, 골아세포 분화 배양액으로 10일 간 분화유도 후, Western blot analysis를 이용해 단백질에서의 STAT 유전자들의 발현 양상을 관찰하였다. 분화기간 동안 STAT1, STAT2, STAT3, 그리고 STAT6의 발현이 대조군과 비교하였을 때 차이가 없었고, STAT4는 중간엽 줄기세포에서 발현하지 않았다. 그러나 STAT5A와 STAT5B의 경우 발현이 분화기간 동안 대조군에 비해 시간이 지남에 따라 증가하였다(Fig. 1A). Von kossa 염색을 통해 골아세포로의 분화가 진행되었음을 확인하였다(Fig. 1B). 인산화된 STAT5도 시간이 지남에 따라 대조군에 비해 활성이 증가하였지만, 골아세포 분화기간 동안 인산화 활성이 14일 쯤까지 지속되는 것을 확인하였다(Fig. 1C). 따라서 STAT5A와 STAT5B는 골아세포 분화와 관련이 있을 것으로 추측된다. 골아세포로의 분화

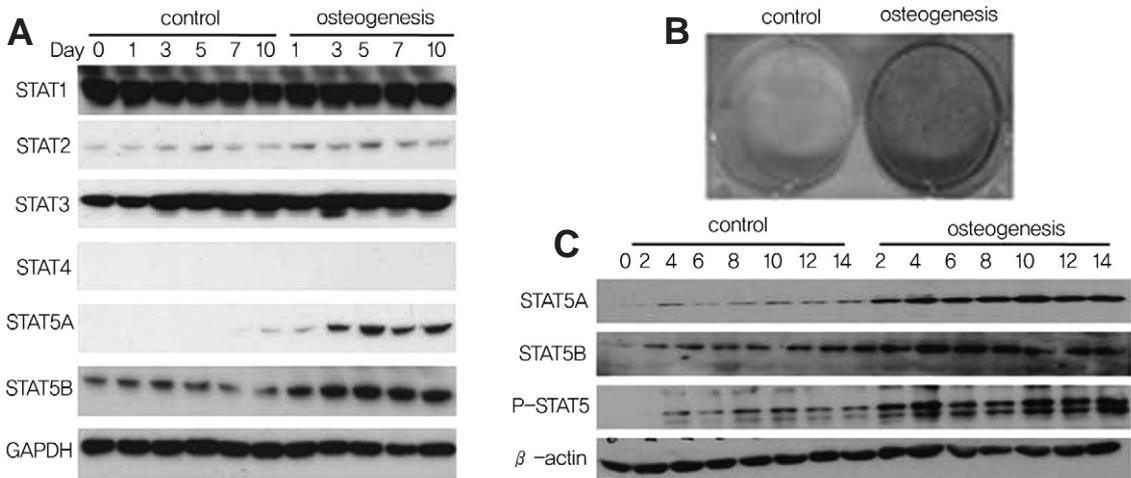


Fig. 1. Expression of STAT5a and STAT5b in osteogenesis. MSC were differentiated to osteoblasts using osteogenic medium. The expression of STATs was confirmed by western blot analysis. (A) The expression of STATs family was analyzed at different time points after the induction of differentiation. (B) The cells were stained with Von Kossa on day14 after induction of differentiation. (C) The expression of phosphorylated STAT5 during osteogenesis.

기간 동안에는 STAT5A와 STAT5B의 발현이 2 일째에 증가하여 14일째까지 유지되었다. 유전자 발현 양상을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, STAT5A와 STAT5B의 유전자발현이 골아세포로 분화 유도한 후 2일째까지 증가하여 2주간 유지되었다(Fig. 2A). 또한 골아세포 표지인자인 ALP (Alkaline Phosphatase)의 증가와 골아세포 분화유도 유전자인 MSX2의 유전자발현으로 골아세포로의 분화가 되었음을 확인하였다. 이를 정량화하면, STAT5A의 경우 분화유도를 시작한지 4일째에 2배 증가하였고, 10일째가 지나면서 발현이 4배 증가한 후 유지되었다. STAT5B도 분화유도를 시작한지 10일째에 약 4배 증가하였고 14일째까지 유지되는 것을 보았다. 골아세포 표지인자인 ALP는 분화유도 시작 후, 2일째부터 증가하였고 14일째까지 계속 증가하여 0일째 비해 약 30배까지 증가하였다(Fig. 2B).

2. STAT5A와 STAT5B를 억제시켰을 때 골아세포 분화에 미치는 영향

골아세포 분화기간 동안 STAT5A와 STAT5B가 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포배양기간 동안 STAT5A와 STAT5B의 발현을 억제시킨 후 골아세포 분화를 유도하였다. 분화유도 14일 후, Von Kossa염색을 통하여 분화력을 확인한 결과, 대조군에 비해 STAT5A siRNA를 처리한 군은 골아세포로의 분화가 현저히 증가되는 것을 관찰하였으며, STAT5B siRNA를 처리한 군에서는 골아세포로의 분화가 대조군과 비교하였을 때 변화가 없었다(Fig. 3A). 또한, RNA interference에 의한 STAT5A와 STAT5B의 감소는 real-time PCR을 통해 각각의 mRNA를 측정함으로써 확인 하였다(Fig. 3B).

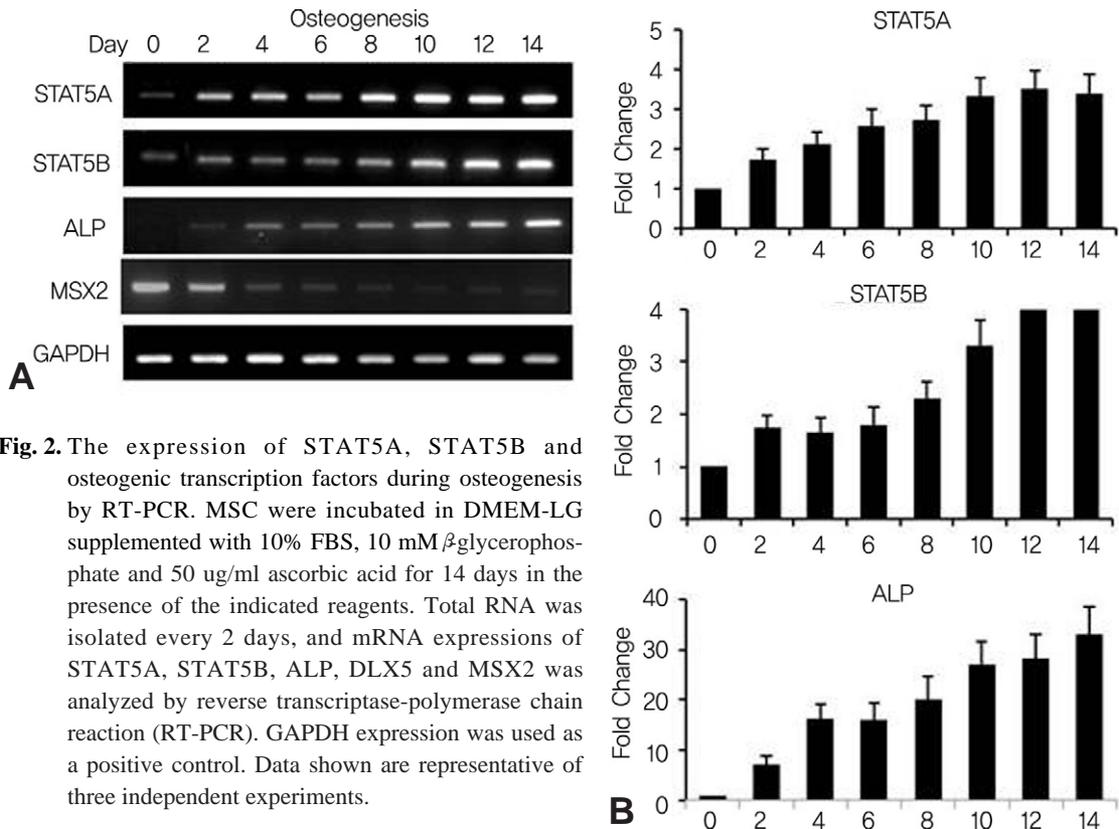


Fig. 2. The expression of STAT5A, STAT5B and osteogenic transcription factors during osteogenesis by RT-PCR. MSC were incubated in DMEM-LG supplemented with 10% FBS, 10 mM β glycerophosphate and 50 μ g/ml ascorbic acid for 14 days in the presence of the indicated reagents. Total RNA was isolated every 2 days, and mRNA expressions of STAT5A, STAT5B, ALP, DLX5 and MSX2 was analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). GAPDH expression was used as a positive control. Data shown are representative of three independent experiments.

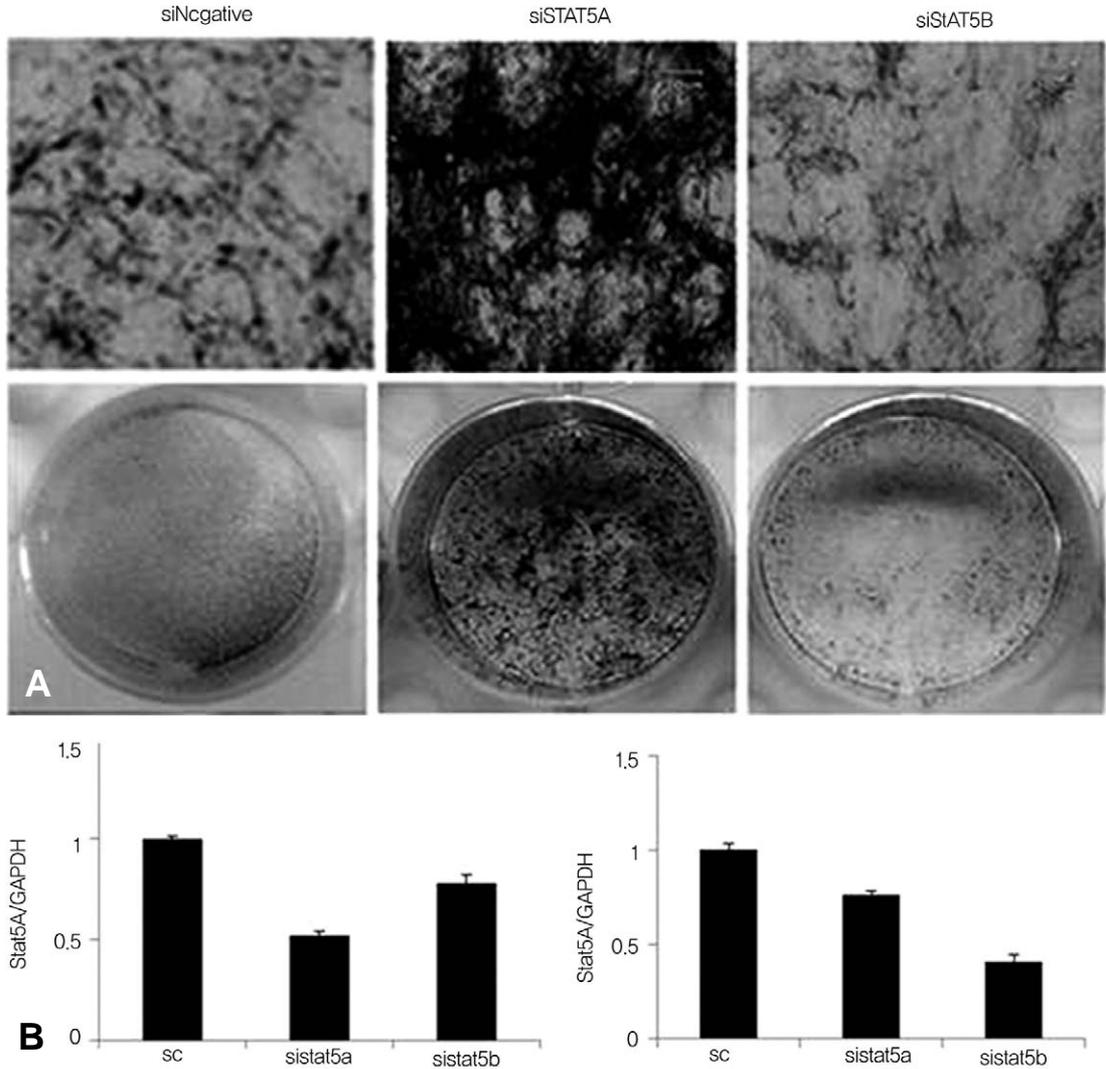


Fig. 3. The effect of STAT5 on osteogenesis of BMSCs. siSTAT5A had effectively increased osteoblast differentiation. (A) The cells were stained with Von kossa on day 14 after induction of differentiation. (B) The mRNA expressions of STAT5A, STAT5B by RNA interference.

3. STAT5A와 골아세포 관련 유전자와의 상관 관계

STAT5A의 전사활성을 조절하는 골아세포 분화와 관련 전사인자를 선별하기 위해 Luciferase assay 를 수행하였다. STAT5A 프로모터 -2121/+88 부위로 reporter vector를 제작한 후, STAT5A, DLX5, MSX2 overexpression vector를 각각 형질주입을 하였다. MSX2는

STAT5A의 전사활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). STAT5A는 STAT5A 프로모터에 작용하여 전사활성을 억제시킨 반면, DLX5는 STAT5A 프로모터에 작용하여, STAT5A의 전사활성을 약 8배 증가시켰다(Fig. 4A). DLX5 overexpression vector는 STAT5A 뿐만 아니라, 다른 골아세포 분화의 관련 유전자인 MSX2와 Osterix에서도 이들의 전사활성을 촉진시켰다. 그리고 STAT5A overexpression vector는

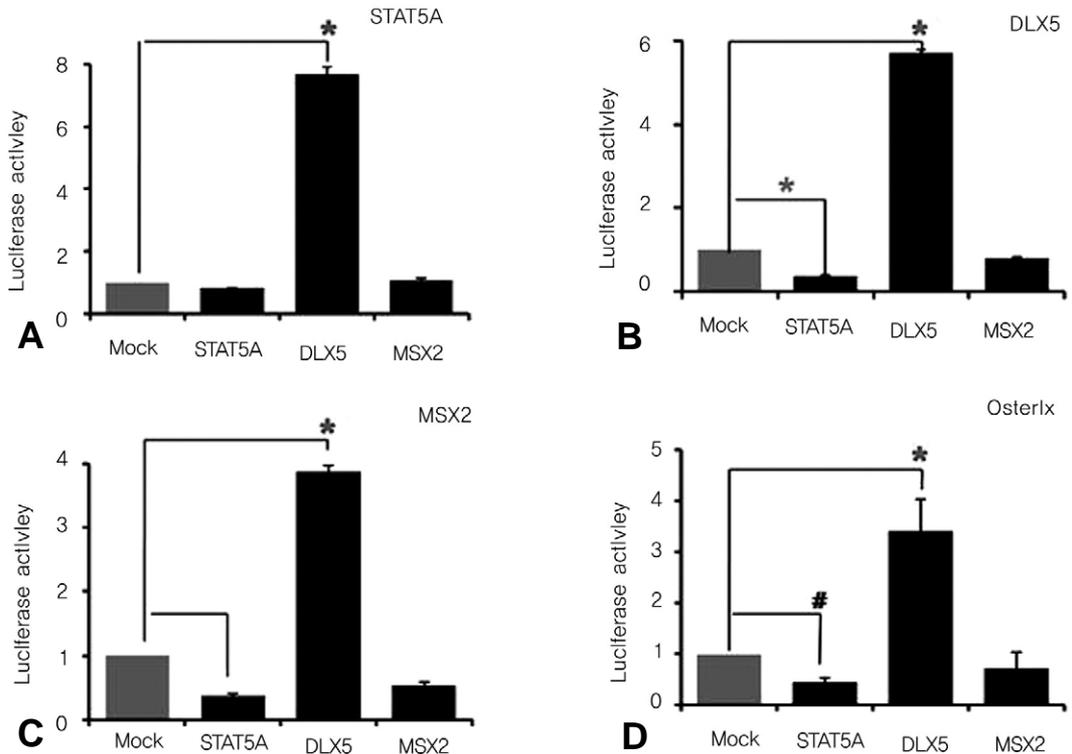


Fig. 4. Transcriptional activity of STAT5A by STAT5A, DLX5 and MSX2 overexpression vector. **(A)** Transcriptional activity was measured in STAT5A promoter(-2121/+88) by STAT5A, DLX5 and MSX2 overexpression vectors using luciferase assay. **(B)** Transcriptional activity was measured in DLX5 promoter(-2000/+340) by STAT5A, DLX5 and MSX2 overexpression vectors using luciferase assay. **(C)** Transcriptional activity was measured in MSX2 promoter(-1969/+428) by STAT5A, DLX5 and MSX2 overexpression vectors using luciferase assay. **(D)** Transcriptional activity was measured in Osterix promoter(-1990/+128) by STAT5A, DLX5 and MSX2 overexpression vectors using luciferase assay. The assays were repeated in at least three experiments. Asterisk(*) indicates $P < 0.05$ versus mock vector group.

골아세포 관련 유전자인 DLX5, MSX2, Osterix 각각의 전사활성을 억제하였다. 특히, STAT5A는 DLX5의 전사활성을 약 70% 정도 감소시켰다(Fig. 4).

고찰

기존 연구에서 중간엽 줄기세포가 다양한 세포로 분화될 수 있는 다분화능이 밝혀지면서 다양한 질환의 치료 가능성이 보고되고 있다. 현대사회에서 노령화된 인구에서 골절이 증가되고 있는데, 이런 사실은 골다공증이 위험한 요소로 알려져 있다. 최근에 골다공증은 대표적인 노인성질환으로 치료법개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

노화에 따른 골다공증을 치료하기 위해서는 지방과 골의 관련성을 이해해야 한다. 골조직이 감소되면 반대로 지방조직이 증가하므로, 정상적인 골격유지를 위해 골아세포와 지방세포로의 분화의 균형유지가 필수적이다³⁾. 세포의 생물학적 기능은 세포내에서 발현되는 유전자의 발현을 조절하는 다양한 세포신호들의 복잡한 전달과정이 관여함으로써 조절된다.

중간엽 줄기세포에서 지방세포 분화기간 동안 STAT5의 전사활성 조절을 분석한 결과, C/EBP α 와 C/EBP β 는 STAT5의 전사활성을 촉진하고, PPAR γ 는 STAT5A의 전사활성을 촉진하였으며, STAT5A와 STAT5B의 발현이 억제되면 지

방세포로의 분화가 억제되었다⁶⁾. 지방세포로의 분화과정 동안 STAT5가 중요한 역할을 한다는 점에서 골아세포와 STAT5의 연관성에 대한 본 연구는 의미가 있다고 사료된다. 본 연구에서 골아세포로의 분화기간 동안 STAT5A와 STAT5B의 발현이 초기에 증가하여 발현량이 유지되었으며, 이는 STAT5가 골아세포로의 분화기간 동안 중요한 역할을 할 것이라고 사료된다.

골아세포로의 분화에는 Cbfa1/Runx2와 Osterix가 중요한 역할을 한다^{12,13,19)}. Runx2의 유전자가 knockout된 쥐의 경우 연골내골화와 막내골화가 모두 일어나지 않아 태아는 개체발생 중에 사망하게 된다. Cbfa1/Runx2는 골아세포 분화과정에서 항상 높은 발현 정도를 보이며 여러 전사인자들이 결합하여 그 작용을 항진하거나 억제한다. Osterix는 Runx2보다 하위에서 작용하는 것으로 알려져 있다. Osterix를 Knockout시킨 경우 중간엽 줄기세포로부터 골아세포의 분화가 억제되며, SOX9과 Collagen type2 등 연골형성의 표지자를 지닌 세포로 분화한다^{15,19)}. MSX2와 DLX5는 중간엽 줄기세포에서 골아세포의 분화유도에 중요한 전사인자로서 골 형성에 필수적이다. MSX2가 Knockout된 쥐의 경우 두개골 형성에 장애를 보이게 된다. 중간엽 줄기세포에서 MSX2는 골아세포 증식과 분화를 촉진하거나, Runx2의 활성을 억제시킨다. DLX5는 Runx2의 발현과 골표지인자인 BSP와 Osteocalcin의 발현을 촉진한다^{13,18)}. 또한, DLX5의 과다한 발현은 오히려 비정상적인 골형성을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 본 연구에서도 DLX5 mRNA 발현이 분화 과정 중 증가하다가 변화가 없었고, MSX2는 골아세포 증식과 분화를 촉진시키며 분화 유도 초기에 발현 하며 점차 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

STAT은 면역체계에서 많이 연구가 된 유전자이다. 중간엽 줄기세포 분화에 대한 연구는 거의 없다^{1,21)}. STAT은 동형접합체나 이형접합체를 이루어 핵으로 이동하고, 전사인자를 활성화시킨다. 또한 인산화 되지 않은 STAT은 다른 전사인자와 상호작용을 하고, 전사활성을 자극시켜준다¹⁷⁾. 본 실험에서 인산화된 STAT5가 골분화 기간 동안 활성화된 것은 STAT5가 핵 안에서 다른 전사인

자와 결합을 하여 분화에 영향을 주는 것이라 사료된다.

STAT1은 골아세포 분화 기간 동안 Runx2의 활성을 억제시켜주고, STAT1이 억제되었을 때 골 형성이 증가된다고 알려진바 있다¹⁴⁾. 또한 STAT5와 Runx2는 서로 상호작용을 하여 전사활성을 억제한다고 알려져 있다¹⁴⁾. 본 연구에서는 STAT5A가 억제되면, 골아세포 분화능력이 증가되는 것을 확인하였다. 이는 STAT5A가 골아세포로의 분화를 억제하는 것을 의미한다.

중간엽 줄기세포에서 골아세포로 분화에는 다양한 전사인자가 필요하다. DLX5는 골아세포 석회화에 관여하고, 골 형성과 골 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. MSX2는 골아세포의 분화와 증식을 촉진 하지만, Runx2활성과 골아세포 표지유전자를 억제한다. 골 형성이 되는 동안 MSX2는 골아세포의 사멸을 조절한다¹⁴⁾. 본 연구를 통해 골아세포의 표지유전자에 의한 STAT5A의 전사활성이 조절되는지 알아본 결과, DLX5는 STAT5A, MSX2, Osterix 전사활성을 높이는 것을 확인하였다. 또한 STAT5A는 DLX5, MSX2, Osterix 전사활성을 억제하였다. 본 연구에서 DLX5가 STAT5A와 상호작용 하여 STAT5A의 전사활성을 약 8배 촉진시켰으며, 증가된 STAT5A는 다시 DLX5의 전사활성을 감소 시킴으로써, 골분화에서의 과다한 DLX5의 발현을 조절하는 것으로 사료된다. 본 실험에서 중간엽 줄기세포의 골아세포 분화 기간 동안 STAT5의 역할을 알아본 결과 STAT5A는 골아세포 분화 능력을 억제하였다. 이는 골아세포 분화에 중요한 전사인자인 DLX5와 상호작용하여 분화에 영향을 미칠 것으로 보인다.

이 외에도 본 연구는 한 가지 측면에서 제한점을 가지고 있다. Luciferase assay를 통해 DLX5가 STAT5A의 프로모터에 직접적으로 결합하는지 확인하기 위해서는 chip assay (Chromatin Immunoprecipitation)가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

STAT5A는 골아세포 분화기간 동안 발현이 증

가하여 DLX5의 발현을 조절함으로써 비정상적인 골아세포 분화를 저해할 것이다. 이런 STAT5A는 지방세포와 골아세포 분화의 균형을 조절하고 골다공증의 세포 치료제로써 중요한 역할을 가질 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) **Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey PB, Perrimon N:** Signaling role of hemocytes in drosophila JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell*, 5: 441-450, 2003.
- 2) **Barron F:** Downregulation of Dlx5 and Dlx6 expression by Hand2 is essential for initiation of tongue morphogenesis. *Development*. 138(11): 2249-59, 2011
- 3) **Darnell JE:** STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635, 1997.
- 4) **Delorme B, Charbord P:** Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*, 140: 67-81, 2007.
- 5) **Duque G:** Bone and fat connection aging bone. *Curr Opin Rheumatol*, 20: 429-434, 2008.
- 6) **Grimley PM:** STAT5A and STAT5B: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10: 131-157, 1999.
- 7) **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al:** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2000.
- 8) **Jung HS, Lee YJ, Kim YH, Paik SI, Kim JW, Lee JW:** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma/signal transducers and activators of transcription 5a pathway plays a key factor in adipogenesis of human bone marrow-derived stromal cells and 3T3-L1 preadipocytes. *Stem Cells Dev*, 2011.
- 9) **Karsenty G:** The complex role of skeletal biology. *Nature*, 423: 316-318, 2003.
- 10) **Kim SH, Koga T, Isobe M, et al:** Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes & Dev*, 17: 1979-1991, 2003.
- 11) **Kim YJ, Lee MH, Cho JY and Ryoo HM:** Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *The J of Biol Chem*, 279: 50773-50780, 2004.
- 12) **Lee RH, Kim B, Choi I, et al:** Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*, 14: 311-324, 2004.
- 13) **Levy DE, Darnell JE:** Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 651-662, 2002.
- 14) **Liping X, Takahiro N, Eneze O, et al:** Stat1 control postnatal bone formation by regulating fibroblast growth factor signaling in osteoblasts. *The J of Biol Chem*, 279: 277943-27752, 2004.
- 15) **Mackie EJ:** Osteoblast: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*, 35: 1301-1305, 2003.
- 16) **Pierre J, Marie:** Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochem and Biophys*, 473: 98-105, 2008.
- 17) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
- 18) **Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T:** Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol*, 11: 1681-1694, 1997.
- 19) **Shuai K:** The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol*, 71: 405-422, 1999.
- 20) **Stains JP:** Civitelli R-Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol*, 4: 222, 2003.
- 21) **Toshihisa K:** Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J of Cell Biochem*, 99: 1233-1239, 2006.