

## Identification of Genes Modulated by High Extracellular Calcium in Coculture of Mouse Osteoblasts and Bone Marrow Cells by Oligo Chip Assay

Hyung-Keun Kim, Mina Song, Ji Hae Jun, Kyung Mi Woo, Gwan-Shik Kim, and Jeong-Hwa Baek\*

Dept. of Pharmacology and Dental Therapeutics, School of Dentistry & Dental Research Institute, Seoul National University

(Received May 3, 2006 ; Accepted May 24, 2006)

Calcium concentration in the bone resorption lacunae is high and is in the mM concentration range. Both osteoblast and osteoclast have calcium sensing receptor in the cell surface, suggesting the regulatory role of high extracellular calcium in bone metabolism. In vitro, high extracellular calcium stimulated osteoclastogenesis in coculture of mouse osteoblasts and bone marrow cells. Therefore we examined the genes that were commonly regulated by both high extracellular calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>vitaminD<sub>3</sub> (VD3) by using mouse oligo 11 K gene chip. In the presence of 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> or 10 nM VD3, mouse calvarial osteoblasts and bone marrow cells were co-cultured for 4 days when tartrate resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells start to appear. Of 11,000 genes examined, the genes commonly regulated both by high extracellular calcium and by VD3 were as follows; 1) the expression of genes which were osteoclast differentiation markers or were associated with osteoclastogenesis were up-regulated both by high extracellular calcium and by VD3; trap, mmp9, car2, ctsk, ckb, atp6b2, tm7sf4, rab7, 2) several chemokine and chemokine receptor genes such as sdf1, scya2, scyb5, scya6, scya8, scya9, and ccr1 were up-regulated both by high extracellular calcium and by VD3, 3) the genes such as mmp1b, mmp3 and c3 which possibly stimulate bone resorption by osteoclast, were commonly up-regulated, 4) the gene such as c1q and msr2 which were related with macrophage function, were commonly down-regulated, 5) the genes which possibly stimulate osteoblast differentiation

and/or mineralization of extracellular matrix, were commonly down-regulated; slc8a1, admr, plod2, lox, fosb, 6) the genes which possibly suppress osteoblast differentiation and/or mineralization of extracellular matrix, were commonly up-regulated; s100a4, npr3, mme, 7) the genes such as calponin 1 and tgfb1 which possibly suppress osteoblast differentiation and/or mineralization of extracellular matrix, were up-regulated by high extracellular calcium but were down-regulated by VD3. These results suggest that in coculture condition, both high extracellular calcium and VD3 commonly induce osteoclastogenesis but suppress osteoblast differentiation/mineralization by regulating the expression of related genes.

**Keywords:** high extracellular calcium, coculture of osteoblasts and bone marrow cells, osteoclast, oligo chip assay.

### 서 론

골개조는 골흡수와 그와 연계된 골형성에 의해 이루어지며 골량이 유지되기 위해서는 이 두 과정이 정교하게 조절되어야 한다(Canalis 등, 1988). 골형성을 담당하는 조골세포는 중간엽 줄기세포에서 유래되며, 골흡수를 담당하는 파골세포는 조혈모세포에서 유래한다. 파골세포의 분화를 유도하는데 조골세포와 파골세포 전구세포간의 상호작용이 파골세포 분화에 필수적인 것으로 보고되고 있다. 특히 이러한 상호작용에 관련된 인자 중 현재까지 알려진 대표적 인자는 조골세포에서 발현되는 receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) 및 macrophage colony stimulating factor(M-CSF)와 파골세

\*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Dept. of Pharmacology and Dental Therapeutics, School of Dentistry, Seoul National University. Tel.: +82-2-740-8688; Fax.: +82-2-741-3193; E-mail: baekjh@snu.ac.kr

포 전구세포에서 발현되는 이들에 대한 수용체 RANK 및 c-fms이다(Quinn 등, 1998). 또한 조골세포에서 생산되는 osteoprotegerin은 RANKL이 RANK에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제함으로써 파골세포분화를 억제하는 조절인자로 작용한다(Quinn 등, 1998). Interleukin(IL)-1, IL-11, IL-17, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\beta$ , prostaglandin E2, parathyroid hormone, 17 $\beta$ -estradiol, dexamethasone, 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>) 등과 같은 다양한 국소인자와 호르몬이 파골세포 분화를 조절하며, 이러한 과정에서 조골세포의 RANKL과 osteoprotegerin의 발현 조절이 관련되는 것으로 보고되었다(Suda 등, 1999; Hofbauer 등, 2000).

칼슘은 세포 분비, 유전자 발현, 화학주성, 세포증식 및 분화, 세포사 등 다양한 과정을 조절하는데 관여한다(Brown과 MacLeod, 2001). 특히 골조직에서는 골흡수가 진행될 때 파골세포와 골조직 사이의 칼슘농도가 40 mM까지도 높아지며, 파골세포와 조골세포 모두 세포외칼슘을 감지하는 수용체를 가지고 있으므로, 고농도 세포외칼슘이 골개조에 조절작용을 나타낼 것으로 생각되고 있다(Kameda 등, 1998, Yamaguchi 등, 1998). 고농도 세포외칼슘은 조골세포의 화학주성, 성장을 촉진시키는 것으로 알려졌으나(Godwin과 Soltoff, 1997; Huang 등, 2001), 조골세포의 분화에 미치는 효과에 대해서는 분화를 억제하거나 촉진한다는 상반된 보고가 있었다(Dvorak 등, 2004; Yamauchi 등, 2005). 또한 고농도 세포외칼슘이 파골세포 분화에 미치는 효과도 파골세포 분화를 유도하기 위한 세포배양 조건에 따라 상반된 결과가 보고되어 왔다. 파골세포 전구세포 배양에 고농도 세포외칼슘을 처리하면 VD<sub>3</sub>에 의해 유도되는 파골세포 분화가 억제되거나(Sugimoto 등, 1993), 조골세포와 골수세포의 혼합배양에 고농도 세포외칼슘을 단독으로 첨가해주면 파골세포의 분화가 증가하며 이 과정에서 조골세포의 RANKL 발현 증가가 관련되는 것으로 알려졌다(Takami 등, 2000; Shin 등, 2003). 또한 고농도 세포외칼슘은 조골세포의 세포내칼슘 수준을 증가시키며 p44/42 mitogen-activated kinase의 활성화를 통하여 RANKL 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2003; Tsai 등, 2004). 이러한 보고들은 고농도 세포외칼슘이 조골세포 또는 파골세포전구세포에 대한 직접적 조절작용을 통해 골대사의 조절에 관여할 것을 시사하지만 고농도 세포외칼슘에 의해 발현이 조절되는 유전자에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 조골세포와 골수세포의 혼합배양에서 고농도 세포외칼슘을 처리하고 생쥐유전자에 대한 oligo chip 분석을 시행하여 고농도 세포외칼슘에 의한 유전자 발현 조절 양상을 알아보기로 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 실험 재료

ICR 생쥐는 샘타코(오산시, 대한민국)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM),  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM), fetal bovine serum (FBS), crude collagenase, trypsin-EDTA 등은 Gibco laboratories(Grand Island, NY, USA)에서, plastic tissue culture wares는 Corning Inc. (Corning, NY, USA)에서 구입하였다. easy-BLUE™은 iNtRON biotechnology(서울, 대한민국)에서 구입하였으며, tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) staining kit 및 기타 사용된 약물은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 조골세포와 골수세포의 분리 및 배양

조골세포를 얻기 위해 생후 2-3일된 ICR 생쥐에서 전두골과 두정골을 분리하고 0.1% crude collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA로 구성된 효소용액에서 10분, 10분, 10분, 20분, 20분, 20분 씩 연속적으로 효소처리하여 I~VI군의 골세포군을 분리하고, 이중 조골세포의 형질을 가진 세포가 많은 것으로 알려진 IV~VI군의 세포를 모아 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였으며, 일차 계대배양 후 각 실험에 사용하였다.

생후 4-6주된 생쥐의 경골 및 대퇴골을 무균적으로 적출하고, penicillin-streptomycin을 포함한 Hank's balanced salt solution으로 2회 세척 후 연조직을 제거하고 골간부를 분리하였다. 22 gauge 주사침을 이용하여 5 ml의  $\alpha$ -MEM을 골간부에 주입하여 골수세포를 수집하고, 0.83% NH<sub>4</sub>Cl-10 mM Tris-HCl(pH 7.4)을 이용하여 적혈구를 제거하였다. 그 후 10%의 FBS가 들어있는  $\alpha$ -MEM으로 두 번 세척한 후, 세포수를 계수하여 혼합배양에 사용하였다.

### 조골세포와 골수세포의 혼합배양

파골세포 생성 정도를 확인하기 위해 조골세포와 골수세포를 24 well tissue culture plate에 각각 well 당  $1.5 \times 10^4$  및  $3 \times 10^5$ 개를 분주한 후 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM으로 24시간 배양하였다. 그 후 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 고농도 세포외칼슘을 농도별로 첨가하여 7일간 배양하였다. 배양 중 매 2일 마다 배양액을 교체하였다.  $\alpha$ -MEM에 칼슘이 1.8 mM 포함되어 있기 때문에 고농도 세포외칼슘 처리군에서는 1 M CaCl<sub>2</sub>를 이용하여 배양액내 칼슘농도를 5, 7 또는 10 mM로 맞추어 주었다. 배양이 끝난 후 파골세포 생성정도를 확인하고자 TRAP 염색을 시행하였으며, 핵이 3개 이상 포함된 TRAP 양성 다핵세포를 파골세포로 계수하였다.

Oligo Chip 분석을 시행하기 위해서는 60 mm 배양접시에 조골세포와 골수세포를 각각  $1.5 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  cells/

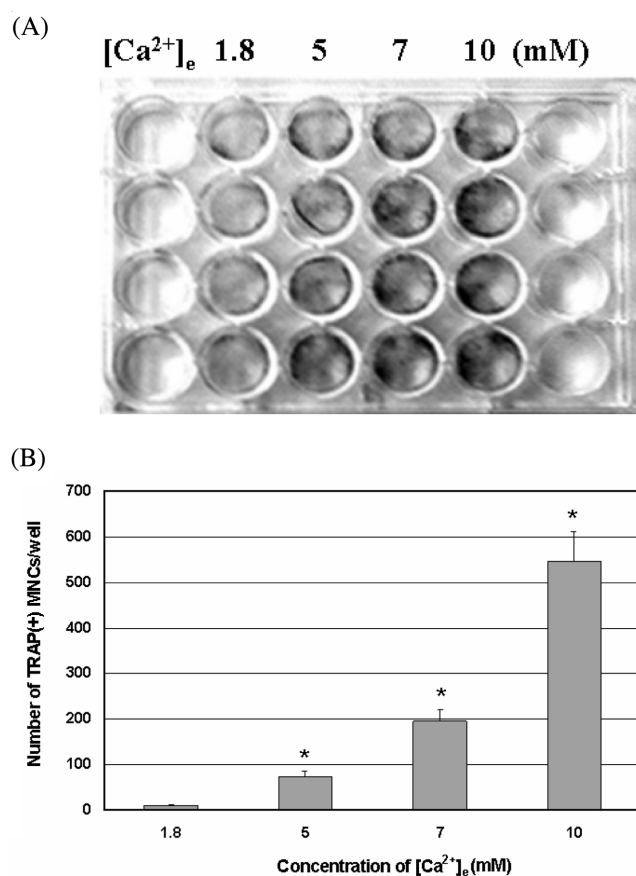
dish가 되도록 분주하고, 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM으로 24시간 배양하였다. 그 후 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 10 mM 세포외칼슘 또는 10 nM VD<sub>3</sub>를 첨가한 후 파골세포가 형성되기 시작하는 시점인 4일까지 배양하였다. 배양이 끝난 후 total cellular RNA를 추출하고 100  $\mu$ g의 total RNA를 이용하여 Mouse Oligo 11 K chip 분석(마크로젠, 서울, 대한민국)에 사용하였다.

### Mouse Oligo 11K chip 분석

다수의 유전자 발현을 관찰하기 위해 마크로젠사의 Mouse Oligo 11K Chip 이용하였으며, 사용된 chip은 분자기능에 따라 분류된 5,993개 유전자와 Biological Process 및 Cellular Component로 분류된 3,003개 유전자를 포함하고 있다. 분석과정은, 먼저 실험간 데이터를 비교하기 위하여 대조군 mRNA 시료와 실험군 mRNA 시료 2종류를 각각 형광물질로 역전사 반응하여 표식하고, RNA 혼합물을 oligo chip 상에서 competitive hybridization하여 시료 간 mRNA 발현량의 차이를 기본 데이터로 분석하였다. 사용된 형광물질은 Cy3와 Cy5가 결합한 dUTP로, 거의 같은 효율로 cDNA에 표식되었으며, 스캐너를 이용하여 oligo chip 상의 각 유전자 spot에 형광 cDNA의 signal을 읽고, 해석 software로 각 유전자의 발현비(mRNA 양)를 얻어 이를 통해 발현정도를 상대 비교하였다.

### 실험 결과 및 고찰

고농도 세포외칼슘에 의한 유전자 발현을 관찰하기에 적절한 칼슘농도를 결정하기 위해 먼저 세포외칼슘 농도를 5, 7, 10 mM로 조절하여 파골세포 생성에 미치는 효과를 확인하였다. 이전에 보고된 비와 같이(Shin 등, 2003), 고농도 세포외칼슘 존재 하에 7일간 배양하였을 때 농도의존적으로 TRAP양성 다핵세포의 생성이 증가됨이 확인되었다(Fig. 1). 10 mM 농도에서 파골세포 생성 정도가 가장 우수하였기 때문에 유전자 발현 분석을 위해 10 mM 농도를 사용하기로 하였으며, 유전자 발현 분석시점은 파골세포 전구세포가 TRAP양성 단핵세포로 분화가 많이 진행되어 다핵세포를 만들기 시작하는 시점인 4일로 정하였다. 또한 파골세포 분화촉진 효과와 관련된 유전자 발현 분석을 비교하기 위해 골수세포와 조골세포의 혼합배양 시스템에서 파골세포 생성을 강력하게 유도하는 10 nM VD<sub>3</sub>를 처리하여 유전자 발현을 비교하였다. 조사한 전체 유전자 중 vehicle만 처리한 대조군에 비해 10 mM 세포외칼슘을 처리해준 경우 2배 이상 발현이 증가된 유전자는 187개, 1/2 이하로 감소된 유전자는 178개였으며, 10 nM VD<sub>3</sub>를 처리해준 경우에는 대조군에 비해 2배 이상 발현이 증가된 유전자가 281개, 1/2 이하로 감소



**Fig. 1.** Effect of high extracellular calcium on osteoclast formation. Mouse calvarial osteoblasts and bone marrow cells were co-cultured for 7 days in the presence of varying concentrations of extracellular calcium. At the end of culture TRAP staining was performed (A) and the number of TRAP-positive multinucleated cells was counted and the statistical analysis was performed by student t-test (B). Data represent mean + S.E. (N=4). \* $p < 0.01$ , significantly different from control ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> 1.8 mM)

된 유전자는 291개가 관찰되었다. 이렇게 발현이 변화된 유전자 중 고농도 세포외칼슘 처리와 VD<sub>3</sub> 처리에서 동시에 발현이 증가, 감소된 유전자가 각각 79개, 42개가 있었다(Table 1, 2). 또한 고농도 세포외칼슘 처리에 의해서는 발현이 증가되었으나 VD<sub>3</sub> 처리에 의해서는 발현이 감소된 유전자가 20개가 있었으며, 반대로 고농도 세포외칼슘에 의해서는 발현이 억제되었지만 VD<sub>3</sub>에 의해서는 발현이 증가한 유전자는 8개가 관찰되었다(Table 3). 조골세포와 골수세포의 혼합배양에서 고농도 세포외칼슘과 VD<sub>3</sub>의 처리에 의해 발현수준이 변화된 유전자를 비교하였을 때 몇 가지 공통적인 발현 양상이 확인되었다. 두가지 처리에서 모두 발현이 증가되는 유전자 중 많은 부분은 파골세포 분화 표지 유전자이거나 파골세포 분화를 조절하는 것으로 알려진 것이었다(Table 1, Fig. 2). 이는 두 처리 모두 파골세포의 분화를 촉진하는 현상과 일치하는 결과였으며, TRAP 염색결과와 유사하게

**Table 1.** The genes commonly up-regulated by both high extracellular calcium and VD3

Gene description	Gene bank Acc. No.	gene expression ratio [log <sub>2</sub> (treat/control)]	
		Ca <sup>2+</sup>	VD3
similar to dna polymerase beta	BC006681	5.5	2.2
eosinophil-associated ribonuclease 2 precursor	AF238402	5.3	4.2
similar to hypothetical protein flj12644	BC007165	4.9	4.1
gamma-aminobutyric acid a receptor gamma 1 subunit	AF156490	4.8	4.7
cystatin 7	NM_009977	4.7	4.6
matrix metalloproteinase 1b (interstitial collagenase, mmp1b)	NM_032007	4.4	4.6
cdna clone homolog to neuronal acetylcholine receptor protein, beta-3 chain precursor	AK017571	4.1	4.9
tartrate-resistant acid phosphatase (trap)	S70805	4.0	4.6
growth factor receptor bound protein 10	NM_010345	3.9	2.7
protocadherin gamma subfamily b, 8	NM_033580	3.8	3.1
seminal vesicle secretion 3	NM_021363	3.8	3.8
zinc finger protein x-linked	NM_011768	3.7	2.0
matrix metalloproteinase 9 (mmp9)	NM_013599	3.5	5.4
membrane component, surface marker 1	NM_008536	3.5	2.2
eosinophil-associated ribonuclease 4	NM_017389	3.5	3.6
podocalyxin-like	NM_013723	3.4	3.4
pancreatic lipase related protein 1	NM_018874	3.4	2.6
sodium channel, voltage-gated, type iv, alpha polypeptide	NM_133199	3.3	3.5
nebulin	U58108	3.2	2.0
cerebellin 1 precursor protein	NM_019626	2.9	2.6
matrix metalloproteinase 3 (mmp3)	NM_010809	2.8	1.8
monocytic adaptor	NM_010815	2.8	2.6
5730511k23rik	NM_019458	2.7	1.8
udp glycosyltransferase 2 family, polypeptide a1	NM_053184	2.6	2.5
carbonic anhydrase 2 (car2)	NM_009801	2.4	4.4
transmembrane 7 superfamily member 4 (tm7sf4)	AK154384	2.4	3.3
sialyltransferase 7	NM_012028	2.4	1.7
cathepsin k (ctsk)	NM_007802	2.4	3.5
bbs2	AF342737	2.3	1.3
protein kinase, camp dependent, catalytic, alpha	NM_008854	2.3	1.4
solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1 (slc37a1)	NM_020258	2.2	3.4
similar to ad-003 protein	BC027220	2.2	1.4
excision repair 3 (ercc3)	NM_133658	2.2	1.0
similar to riken cdna 0610007105 gene	BC015275	2.2	3.6
metallothionein 3	NM_013603	2.1	2.6
glucocorticoid-induced leucine zipper	NM_010286	2.1	1.1
sushi-repeat-containing protein, x-chromosome	NM_016911	2.1	1.5
growth differentiation factor 9	NM_008110	2.0	2.0
membrane metallo endopeptidase (mme)	NM_008604	2.0	1.5
dtdp-d-glucose 4,6-dehydratase (ec 4.2.1.46)	AK011555	1.8	1.7
small inducible cytokine b subfamily, member 5 (scyb5)	NM_009141	1.8	2.3
stromal cell derived factor 1, isoform alpha precursor (sdf1)	NM_021704	1.8	2.6
creatine kinase, brain (ckb)	NM_021273	1.7	1.9
beta defensin containing protein data source	AK016897	1.7	3.2
small inducible cytokine a9 (scya9)	NM_011338	1.7	2.3

**Table 1.** The genes commonly up-regulated by both high extracellular calcium and VD3 (continued)

Gene description	Gene bank Acc. No.	gene expression ratio [log <sub>2</sub> (treat/control)]	
		Ca <sup>2+</sup>	VD3
inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	NM_018864	1.7	1.2
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4 (ercc4)	NM_015769	1.7	1.4
homolog to brush border 61.9 kda protein precursor	AK019469	1.7	2.2
atpase, h+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), beta 56/58 kda, isoform 2 (atp6b2)	NM_007509	1.6	2.4
small inducible cytokine a2 (scya2)	NM_011333	1.6	1.2
small inducible cytokine a8 (scya8)	NM_021443	1.5	4.9
interleukin 1 receptor antagonist	NM_031167	1.5	2.0
fyve and coiled-coil domain containing 1	AJ428065	1.5	1.1
metaxin 2	NM_016804	1.5	1.4
c-type lectin, superfamily member 10	NM_020001	1.5	2.1
synembryn	NM_053194	1.5	1.0
tail fibroblast receptor for feline leukemia virus subgroup c	AF239767	1.5	1.0
natriuretic peptide receptor 3 (npr3)	NM_008728	1.5	1.5
granzyme d	NM_010372	1.4	2.5
casein kinase ii, alpha 1 related sequence 4	NM_007788	1.4	1.5
mts1 protein (s100 calcium binding protein a4, s100a4)	X16190	1.4	2.0
rab7, member ras oncogene family (rab7)	NM_009005	1.4	1.1
pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_009344	1.4	1.7
t-cell death associated gene	NM_009344	1.3	1.2
regulator of g-protein signaling 4	NM_009062	1.3	1.2
anaphase-promoting complex subunit 7	NM_019805	1.3	1.6
complement component c3 prepropeptide, last (c3)	J00369	1.3	2.5
estrogen related receptor, beta	NM_011934	1.3	2.2
brp39 protein (chitinase 3-like 1)	X93035	1.2	1.9
chemokine (c-c) receptor 1 (ccr1)	NM_009912	1.2	1.8
small inducible cytokine a6 (scya6)	NM_009139	1.2	3.8
nf-kb inhibitor, alpha (nfkbia)	NM_010907	1.1	1.5
phosducin-like	NM_026176	1.1	1.4
a kinase anchor protein 4	NM_009651	1.1	1.9
alanyl (membrane) aminopeptidase	NM_008486	1.1	1.6
vaccinia related kinase 2 (vrk2)	BC013520	1.1	1.0
kinesin family member 5a	NM_008447	1.1	1.3
spermine synthase	NM_009214	1.0	1.0
breast cancer anti-estrogen resistance 3	NM_013867	1.0	1.2

VD3의 처리시 발현 증가정도가 더 크게 나타났다(TRAP 염색결과 제시하지 않음). 그러나 4일간 배양시 TRAP 양성 다핵세포가 막 나타나는 시기이므로, 파골세포 분화표지 유전자가 모두 유의한 발현 증가를 보이지는 않았다. 고농도 세포외칼슘과 VD3를 4일간 처리함에 의해 발현 증가가 확인된 파골세포 분화표지 유전자로는 trap

(tartrate-resistant acid phosphatase), mmp9 (matrix metalloproteinase 9), car2 (carbonic anhydrase 2), ctsk (cathepsin K), atp6b2 (vacuolar H<sup>+</sup> ATPase)가 있었다 (Fig. 2). 이들 이외에도 파골세포 분화와 관련될 것으로 보이는 몇 가지 유전자인 ckb, tm7sf4, rab7도 고농도 세포외칼슘과 VD3에 의해 발현이 모두 증가하였다. 먼

**Table 2.** The genes commonly down-regulated by both high extracellular calcium and VD3

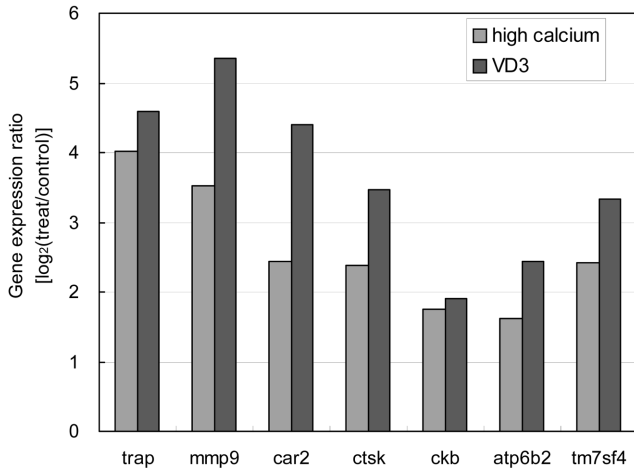
Gene description	Gene bank Acc. No.	gene expression ratio [log <sub>2</sub> (treat/control)]	
		Ca <sup>2+</sup>	VD3
protocadherin gamma subfamily b, 2	NM_033575	-6.3	-6.4
type ii phosphatidylinositol 4-kinase beta	NM_028744	-5.4	-4.1
similar to fkbp-associated protein (glomulin)	NM_133248	-5.1	-3.6
sodium/calcium exchanger NCX1 (slc8a1)	AF409089	-4.7	-3.5
atp-binding cassette protein	AF213383	-4.7	-2.2
immunoglobulin light chain	L14555	-4.3	-2.3
mitogen activated protein kinase kinase 5	NM_011840	-3.9	-2.0
carbonic anhydrase 6	NM_009802	-3.6	-5.3
zinc finger protein zfp110	AF167317	-3.1	-2.3
laminin, alpha 1	NM_008480	-2.8	-3.1
cleft palate-related protein 1	AY074887	-2.8	-1.9
receptor-activity modifying protein 2	NM_019444	-2.6	-1.4
loop tail associated protein	NM_033509	-2.6	-1.7
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	NM_011854	-2.5	-1.6
fk506 binding protein	AF090334	-2.5	-2.3
cd2-associated proten	NM_009847	-2.4	-2.5
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (abcc3)	AK006128	-2.0	-1.3
proline rich membrane anchor 1 (prima1)	AY043275	-1.9	-1.3
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide (c1qa)	NM_007572	-1.9	-1.3
immunoglobulin scavenger receptor	NM_030707	-1.8	-2.4
unc-5 homolog (c. elegans) 3	NM_009472	-1.8	-1.0
adrenomedullin receptor (admr)	NM_007412	-1.7	-1.0
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide (c1qb)	NM_009777	-1.7	-1.4
pancreas specific transcription factor, 1a	NM_018809	-1.7	-1.1
apolipoprotein e (apoe)	NM_009696	-1.6	-1.0
adenylosuccinate lyase	NM_009634	-1.6	-1.6
swi/snf related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, sub-family c, member 1 (smarcc1)	NM_009211	-1.5	-1.2
similar to centaurin-alpha2 protein	BC027165	-1.5	-1.1
similar to hras-like suppressor 3	BC024581	-1.5	-2.3
neutrophil elastase	AF082186	-1.5	-1.4
g protein-coupled receptor 34	NM_011823	-1.4	-1.5
apolipoprotein cii	NM_009695	-1.3	-2.1
cortical thymocyte receptor (x. laevis ctx) like	NM_020518	-1.3	-1.0
urb	AB075019	-1.3	-1.9
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	NM_010501	-1.3	-1.3
procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (plod2)	NM_011961	-1.2	-1.4
tubby-like protein 3	NM_011657	-1.2	-1.0
myosin binding protein c, cardiac	NM_008653	-1.2	-1.0
hypocretin	NM_010410	-1.1	-1.3
cathepsin e	NM_007799	-1.0	-1.2
fbj osteosarcoma oncogene b (fosb)	NM_008036	-1.0	-1.0
lysyl oxidase (lox)	NM_010728	-1.0	-1.7

**Table 3.** The genes regulated in the opposite direction by high extracellular calcium and VD3

Gene description	Gene bank Acc. No.	gene expression ratio [log <sub>2</sub> (treat/control)]	
		Ca <sup>2+</sup>	VD3
melanoma antigen, family a, 3	NM_020017	1.8	-1.1
sialic acid binding Ig-like lectin F (siglec5)	AK087658	1.6	-1.6
synuclein, gamma (snca)	NM_011430	1.6	-0.8
epiregulin	NM_007950	1.6	-1.2
chromodomain helicase dna binding protein 1	NM_007690	1.5	-1.8
synuclein, alpha (snca)	NM_009221	1.5	-2.0
vaccinia related kinase 1	NM_011705	1.5	-1.2
lysyl oxidase-like 3 (lox3)	NM_013586	1.5	-1.5
regulator of g-protein signaling 1	NM_015811	1.5	-1.4
protein tyrosine phosphatase, receptor type, c	NM_011210	1.5	-1.1
ma binding motif protein 3	AK010147	1.3	-2
proteoglycan 3	NM_021400	1.3	-1.7
immunoglobulin-associated alpha	NM_007655	1.3	-1.3
methyltransferase-like 3	NM_019721	1.2	-1.0
potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3 (kcna3)	NM_008418	1.2	-1.4
calponin 1	NM_009922	1.1	-1.0
transforming growth factor, beta induced, 68 kda (tgfb1)	NM_009369	1.0	-1.0
superoxide dismutase 3, extracellular	NM_011435	1.0	-1.0
transforming growth factor, beta 3 (tgfb3)	NM_009368	1.0	-1.0
syndecan 2 (sdc2)	NM_008304	1.0	-1.6
pentaxin related gene (ptx3)	NM_008987	-1.0	1.1
neurotoxin homologue	X70920	-1.0	1.0
protein tyrosine phosphatase phi, insert-free variant	U37467	-1.0	1.2
s100 calcium-binding protein a9 (calgranulin b) (s100a9)	NM_009114	-1.1	1.4
extracellular proteinase inhibitor	NM_007969	-1.3	2.0
transglutaminase 3, e polypeptide (tgm3)	NM_009374	-1.3	1.2
neutrophilic granule protein	NM_008694	-1.4	1.1
leukocyte cell-surface molecule (ly9)	AF246701	-2.5	1.1

저 ckb(creatine kinase, brain)는 뇌에서 주로 발현되는 creatine kinase로 알려져 있으며 정상인에서는 혈청에서 나타나지 않으나 골화성증 환자의 혈청에서는 ckb의 수준이 증가됨이 보고되어(Whyte 등, 1996) 골흡수 조절과 상관관계가 있을 가능성을 제시하고 있으며, 최근 보고에서는 파골세포 분화과정에서 ckb의 발현이 증가됨이 보고되었다(Chang 등, 2004). 또한 tm7sf4(transmembrane 7 superfamily member 4; DC-STAMP)는 파골세포에서 발현되는 세포막단백질로 최근에 알려졌다(Kukita 등, 2004). 그 연구에 따르면 파골세포전구세포에 RANKL을 처리하면 tm7sf4의 발현이 급격히 증가되며, 파골세포 전구세포에 tm7sf4를 과발현시키면 파골세포생성이 증가되고, 이의 발현을 저해하면 RANKL에 의한 파골세포 생성을 억제하므로 tm7sf4가 파골세포 분화과정에 필수적

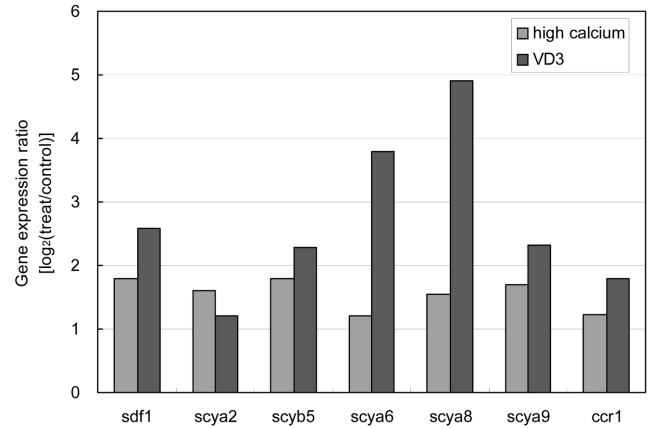
역할을 담당할 것으로 생각된다. 파골세포의 골흡수 기능을 수행하기 위해서는 ruffled border의 형성이 필요하며 이를 위해 vesicular trafficking이 이루어져야 한다. Rab7은 late endosome에 연관된 small GTPase이며, 파골세포에서는 골흡수 중인 ruffled border에 분포되는 것으로 알려져 있다. Rab7의 발현을 저해하면 파골세포의 polarization과 ruffled border로의 vesicle targeting이 억제되어 골흡수를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Zhao 등, 2001). 이는 rab7이 ruffled border formation에 중요한 조절작용을 담당함을 시사하며, 본 연구에서도 고농도 세포외칼슘과 VD3에 의해 발현이 모두 증가되는 것으로 나타나, 아직 TRAP 양성 단핵세포 상태에서도 미리 rab7의 발현이 증가되고 있는 것이 확인되었다. 한편 kcna3(potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member



**Fig. 2.** High extracellular calcium and VD3 increased the mRNA expression levels of osteoclast differentiation related genes. Data represent the average of the results from two independent Oligo Chip analyses. treat; 10 mM  $[Ca^{2+}]_e$  or 10 nM  $1,25(OH)_2$ vitaminD<sub>3</sub>, trap; tartrate-resistant acid phosphatase, mmp9; matrix metalloproteinase 9, car2; carbonic anhydrase 2, ctsk; cathepsin K, ckb; creatine kinase brain, atp6b2; vacuolar proton pump, tm7sf4; transmembrane 7 superfamily member 4

3)는 파골세포에서도 발현되는 potassium channel로 고농도 세포외칼슘에 의해서는 발현이 증가했지만, VD3 처리에 의해서는 오히려 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *kcna3*가 세포-세포외기질 상호작용이나 세포외 양이온인  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ 의 조절을 받는다는 보고와 유사한 결과로 생각된다(Komarova 등, 2001). 한편 *kcna3*의 억제제가 활성화된 T 림프구에서 RANKL/OPG 비율을 감소시키는 보고된 바 있으나(Valverde 등, 2004), 본 연구 시스템에서 조골세포에서도 *kcna3*가 RANKL/OPG 발현 비율조절에 비슷한 작용을 나타낼지는 확실하지 않다.

본 연구에서 고농도 세포외칼슘과 VD3에 의해 발현이 모두 증가되는 유전자 중 chemokine과 chemokine receptor가 몇가지 포함되었으며(Table 1, Fig. 3), 이들 중 다수는 파골세포 분화 촉진과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 *scya9*(macrophage inflammatory protein-1 gamma, MIP-1 $\gamma$ )과 그 수용체인 *ccr1*도 발현이 증가됨이 확인되었는데, 이들은 파골세포에서 발현되는 chemokine/chemokine receptor 중 가장 주요한 것으로 알려져 있다(Lean 등, 2002). 파골세포전구세포에 RANKL을 처리하면 MIP-1 $\gamma$ 의 발현이 크게 증가되며, 또한 그 수용체인 *ccr1*의 발현도 증가된다(Oba 등, 2005). MIP-1 $\gamma$ 를 첨가해주면 RANKL에 의한 파골세포 분화와 생존을 증가시키는 것으로 나타났다(Okamoto 등, 2004). 이러한 보고는 MIP-1 $\gamma$ /*ccr1*이 autocrine pathway로 파골세포 분화에 작용할 것을 시사하고 있다. 본 연구에서 또다른 chemokine으로 *scya2*(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)의 발현이 증가하였는데, MCP-1은 단핵구 recruitment를 유도하



**Fig. 3.** High extracellular calcium and VD3 increased the mRNA expression levels of several chemokine and chemokine receptor genes. Data represent the average of the results from two independent Oligo Chip analyses. treat; 10 mM  $[Ca^{2+}]_e$  or 10 nM  $1,25(OH)_2$ vitaminD<sub>3</sub>, sdf1; stromal cell derived factor 1, scya2; monocyte chemotactic protein 1, scyb5; chemokine(C-X-C) ligand 5, scya6; chemokine(C-C) ligand 6, scya8; monocyte chemotactic protein 2, scya9; macrophage inflammatory protein-1 gamma, ccr1; chemokine(C-C) receptor 1

는 chemokine으로 조골세포에서 발현되며, 골개조 동안 MCP-1의 발현이 증가된다는 보고가 있었다(Graves 등, 1999). 최근 보고에 따르면 파골세포 분화과정에서도 RANKL에 의해 MCP-1의 발현이 증가하며, 이를 첨가 배양하면 RANKL에 의한 파골세포분화를 촉진하고 특히 파골세포전구세포의 융합을 촉진하는 것으로 나타났다(Kim 등, 2005). 파골세포 분화 조절의 중요 전사인자 중 하나인 NFATc1의 결핍에 의해 파골세포 분화가 저해될 때 MCP-1을 첨가하면 회복이 된다는 보고(Kim 등, 2005)는 MCP-1이 파골세포 분화과정 중 NFATc1의 타겟 유전자로 발현되어 파골세포 분화과정에 중요한 역할을 담당할 수 있음을 시사하였다. 그 외에 발현이 증가된 chemokine으로 *sdf-1*(stromal cell derived factor 1)이 있었다. 파골세포전구세포에도 *sdf-1* 수용체인 *cxcr4*가 발현이 많이 되며, *sdf-1*에 의한 chemotaxis와 collagen invasion을 매개하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으나(Yu 등, 2004), *sdf-1*을 bone marrow cell에 첨가 배양한 경우 파골세포분화를 촉진시키는 작용은 없는 것으로 보고되어(Fukuoka 등, 2005), 조골세포에서 많이 발현이 증가된 *sdf-1*의 기능은 아직 명확하지 않다.

이외에 발현 증가가 공통적으로 나타난 유전자 중 파골세포와 관련되는 것으로 알려진 유전자로 C3(complement component c3)가 있었다(Table 1). 이러한 결과는 VD3가 조골세포와 골수기질세포에서 C3의 발현을 증가시킨다는 보고와 유사하였다(Hong 등, 1991). 조골세포에서 분비된 C3는 단핵구, TRAP 양성 파골세포에 있는 C3 수용체에 결합하는 것으로 보고되었다(Sato 등, 1993). 이들

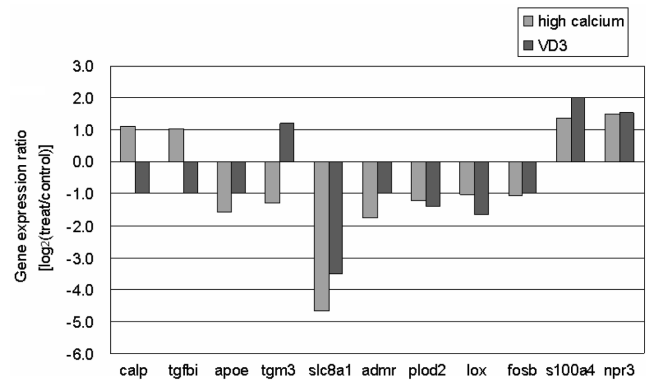


의 보고에 따르면, C3는 TRAP 양성 파골세포 중 핵이 많은 다핵세포에는 결합하지 않았으며, 골수세포 배양에 C3를 첨가하면 M-CSF 의존적인 세포증식을 촉진하고, C3 항체를 처리하면 파골세포의 분화가 억제된다고 하였다(Sato 등, 1993). 이러한 보고로 미루어볼 때, 고농도 세포외 칼슘과 VD3에 의해 발현이 증가된 C3도 파골세포 분화 유도에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

Matrix metalloproteinase(MMP) 중 MMP1과 MMP3의 발현이 두 종류의 처리에 의해 모두 증가되었다(Table 1). MMP1b(matrix metalloproteinase 1b; interstitial collagenase)는 조골세포에서 생성되며, 파골세포에 의한 골흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 보고에 따르면, MMP1b 억제제는 파골세포의 골 부착이나 세포생존에는 별 영향을 미치지 않으나 파골세포에 의한 actin ring 형성과 vacuolar H<sup>+</sup> ATPase가 ruffled border로 분포하는 것을 저해하여 골흡수를 억제하며 이러한 억제효과는 RANKL에 의해 회복되지 못하는 것으로 나타났다(Holliday 등, 2003). 이러한 보고는 MMP-1b에 의해 잘려진 collagen이 파골세포에 의한 골흡수를 촉진함을 시사하고 있다. MMP3(matrix metalloproteinase 3, stromelysin-1)도 조골세포에서 분비되며, estrogen이 결핍되면 조골세포에서 합성이 증가되어 골다공증의 초기 골소실에 관여하고(Breckon 등, 1999), IL-1, IL-6에 의한 두개골 흡수능의 차이는 MMP 생성 정도에 따른 골흡수 정도에 의해 결정된다고 보고된 바 있다(Kusano 등, 1998). 그러므로 조골세포와 골수세포의 혼합배양에서 고농도세포외 칼슘과 VD3가 파골세포 분화를 촉진하는 작용 뿐 아니라 이들에 의해 발현이 증가된 MMP-1b와 MMP-3를 통해 파골세포의 골흡수능을 증가시키는 데도 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

고농도세포외 칼슘과 VD3에 의해 파골세포의 분화가 촉진되고 그와 관련된 유전자 발현이 증가한 반면, 대식세포의 기능과 관련된 c1q(complement component 1, q subcomponent)와 msr2(macrophage scavenger receptor) 유전자는 발현이 모두 감소되었다(Table 2). 또한 Siglec-5(sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 5)와 snca(alpha-synuclein)도 대식세포에서 발현되는 것으로 알려져 있으나(Erickson-Miller 등, 2003; Tanji 등, 2002), 이들은 VD3에 의해서는 발현이 감소된 반면 고농도세포외 칼슘에 의해서는 발현이 증가되었다(Table 3). 이처럼 서로 반대로 조절되는 유전자가 조골세포나 파골세포의 분화, 활성에 어떤 역할을 수행할지는 아직 명확하지 않다.

파골세포 분화와 관련된 기능을 담당하는 유전자의 발현이 대부분 고농도세포외 칼슘과 VD3에 의해 공통적으로 증가되는 양상을 보인 반면, 특이하게 조골세포 분화 및 석회화와 관련된 유전자들은 이들 처리에 의해 조골세포 분화 및 석회화가 억제되는 방향으로 조절되는 경



**Fig. 4.** Effect of high extracellular calcium and VD3 on the mRNA expression levels of several genes which are related to osteoblast differentiation and mineralized nodule formation. Data represent the average of the results from two independent Oligo Chip analyses. treat; 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> or 10 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>. calp; calponin 1, tgfb1; transforming growth factor, beta induced, 68 kda, apoe; apolipoprotein E, tgm3; transglutaminase 3, slc8a1; solute carrier family 8, member 1, admr; adrenomedullin receptor, plod2; procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, lox; lysyl oxidase, fosb; fbj osteosarcoma oncogene b, npr3; natriuretic peptide receptor 3

향을 보였다(Fig. 4). 이에 해당하는 것을 보면, 먼저 fosb (fbj osteosarcoma oncogene b)의 발현이 공통적으로 감소되는 것으로 나타났다. FosB는 AP-1 family member의 하나로 fosb transcripts의 alternative splicing의 결과로 생겨난 deltaFosB와 더불어 조골세포에서 발현된다. deltaFosB를 과발현시킨 마우스는 지방세포 분화를 억제하고 대신 골경화증을 야기하며(Sabatokos 등, 2000), 또한 기계적 자극에 의한 조골세포 분화 유도에도 deltaFosB가 관여할 것으로 보고된 바 있다(Inoue 등, 2004). 따라서 fosb의 발현저하는 조골세포 분화를 억제하는 효과를 나타낼 것을 시사하고 있다. 한편 조골세포의 분화과정에서 type I collagen의 합성이 최대로 일어나는 것은 분화초기에 나타나지만, 실제로 insoluble collagen deposit이 만들어 지는 것은 분화 후반기에 일어난다. 이러한 collagen 침착을 위해서는 collagen cross-link 형성이 필요하며 이 과정에 관여하는 lox(lysyl oxidase)활성을 억제하면 abnormal collagen fibril이 만들어지는 것으로 보고되었다(Hong 등, 2004). 또한 최근 조골세포 분화와 기능을 저해하는 것으로 알려진 TNF- $\alpha$ 가 procollagen 합성에는 영향을 미치지 않으나, lox의 발현과 활성을 감소시켜 collagen 침착을 억제한다는 보고(Pischon 등, 2004)로 미루어볼 때 lox도 조골세포 분화와 석회화 결절형성에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다. Lox의 발현도 두가지 처리에 의해 공통적으로 감소된 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 4). 이와 유사하게 plod2(procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2)도 공통적으로 발현이 감소되었는데, 이는 type I collagen telopeptide의 lysine

residue의 hydroxylation을 일으켜 collagen cross-link를 형성하게 하며, 그 결과 collagen fibril 형성과 석회화에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려진 것이다. Plod2는 분화된 조골세포에서 특이적으로 발현이 증가하며(Uzawa 등, 1999), 이 유전자에 돌연변이가 생기면 osteogenesis imperfecta와 유사한 증상을 나타내는 Bruck 증후군을 야기하는 것으로 알려져 있다(Ha-Vinh 등, 2004). 공통적으로 발현이 억제된 또다른 유전자인 slc8a1(solute carrier family 8, member 1; sodium/calcium exchanger, NCX1)은 조골세포에서 osteoid에 접한 세포막에 발현되어, 세포 내부의  $Ca^{2+}$ 을 osteoid로 이동시켜 석회화를 조절하는 것으로 알려져 있다(Stains 등, 2002).

고농도세포의 칼슘과 VD3에 의해 공통적으로 발현이 감소된 또다른 유전자로 admr (adrenomedullin receptor)과 apoe(apolipoprotein E)가 있었다(Table 2, Fig. 4). Adrenomedullin은 calcitonin, calcitonin gene-related peptide (CGRP)와 일부 homology를 가진 펩티드로 조골세포의 증식을 촉진하며 생체에 투여하면 골형성 촉진효과를 보여 뼈를 강화시킨다. 조골세포에는 adrenomedullin과 그 수용체가 다 발현되므로 국소적 조절인자로 작용할 가능성이 있다(Cornish와 Reld, 2001). Apolipoprotein E는 지질단백 대사에서 중요한 역할을 담당하며, 또한 뼈에도 조절작용을 미치는 것으로 알려져 있다. Apolipoprotein E는 조골세포 배양에서 석회화가 진행될 때 조골세포에서 발현이 현저히 증가되며 조골세포의 vitamin K uptake에 영향을 미쳐 osteocalcin 등의 carboxylation을 조절할 것으로 여겨지고 있다(Schilling 등, 2005).

조골세포 분화 및 석회화 조절 유전자 발현에 대한 억제 효과와 유사하게 조골세포 분화에 negative regulator로 작용할 가능성이 있는 유전자는 고농도세포의 칼슘과 VD3에 의해 공통적으로 발현이 증가된 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 4). S100A4는 세포내 calcium binding protein으로 조골세포에서 발현되며, 석회화가 진행되기 전에 그 발현이 현저히 감소된다. S100A4의 발현을 저해하면 조골세포 분화가 조기에 진행되며 석회화결절 형성도 현저히 증가하는 것으로 나타나, 조골세포 분화와 석회화의 negative regulator로 작용하는 것으로 보고되었다(Duarte 등, 2003). 또한 S100A4를 첨가해주면 농도의존적으로 석회화결절 형성을 저해하며, 세포밖으로 분비되어 보고되어 S100A4가 세포내에서 작용하기 보다는 autocrine 또는 paracrine regulator로 작용함을 시사하였다(Duarte 등, 1999). Npr3(natriuretic peptide receptor 3)는 natriuretic peptide의 clearance receptor이며, 이 수용체에 돌연변이가 있는 경우 brain natriuretic peptide 또는 C-type natriuretic peptide(CNP)의 과발현시와 유사하게 골격 과성장을 야기하는 것으로 보고되었다(Jaubert 등, 1999). CNP와 그 수용체인 GC-B도 조골세포에서 발현되

며, CNP는 조골세포의 분화와 석회화를 촉진하는 것으로 알려졌다. 이러한 결과는 CNP/GC-B 시스템이 조골세포의 autocrine 또는 paracrine regulator로 작용할 것을 시사한다(Suda 등, 1996). 또한 VD3에 의해 CNP의 발현이 증가됨이 보고된 바 있다(Yanaka 등, 1998). 따라서 고농도 세포외칼슘과 VD3에 의해 발현이 증가된 Npr3는 CNP의 작용을 차단함으로써 조골세포 분화 및 석회화에 억제효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 두가지 처리에서 모두 발현이 증가된 유전자 중 하나인 mme(membrane metallo endopeptidase; neprilysin)는 널리 분포하는 세포 표면 zinc-metallopeptidase로서 조골세포 표면에도 발현되는 것으로 알려져 있으며, PTHrp, PTH fragments, calcitonin, CGRP 등 다양한 osteogenic peptides가 이 효소의 기질이 되므로, 이들 local bone peptide factors의 활성을 조절할 수 있는 것으로 보고되었다(Ruchon 등, 2000). 또한 조골세포 분화배양액의 필수요소인 ascorbic acid는 integrin 의존적으로 이 효소의 활성을 저하시킴이 보고되어, 조골세포 분화과정에 mme의 활성 또는 발현 감소가 관련될 것을 시사하였다(Schmid 등, 2005). 이처럼 조골세포의 분화에 negative regulatory effect를 낼 수 있는 유전자의 발현이 고농도 세포외칼슘과 VD3에 의해 모두 증가하면, 결과적으로 조골세포 분화가 억제될 가능성이 있음을 제시하는 결과로 생각된다.

한편 calponin 1, tgfb1은 고농도세포의 칼슘에 의해서는 발현이 증가되나 VD3에 의해서는 반대로 발현이 감소되었다(Table 3, Fig. 4). 이들은 조골세포 분화에 negative regulator로 작용할 것으로 여겨지고 있으므로 고농도세포 외 칼슘에 의한 발현 증가는 조골세포 분화를 억제하는 결과를 나타낼 것으로 생각된다. Calponin 1이 결핍된 생쥐는 bone morphogenetic protein 2에 의해 유도된 골형성을 증가시키며, 그 생쥐의 embryonic mesenchymal cell에 bone morphogenetic protein 2를 처리하면 조골세포 분화가 더 촉진되는 것으로 알려져 있어 calponin 1이 osteogenic program에 negative role을 담당할 것을 시사하고 있다(Yoshikawa 등, 1998). 또한 tgfb1(transforming growth factor, beta induced, 68 kda;  $\beta$ ig-h3)는 조골세포에서 생산되어 골기질에 존재하는 fibrillin-containing microfibril이며, 과발현되면 조골세포의 분화를 억제하는 것으로 알려졌다(Thapa 등, 2005).

Tgm3(transglutaminase 3)는 고농도세포의 칼슘에 의해서는 발현이 감소되나 VD3에 의해서는 반대로 발현이 증가되었다(Table 3, Fig. 4). Transglutaminase는 조골세포에서도 발현되며(Heath 등, 2001), 이를 조골세포 전구세포에 첨가해주면 조골세포 분화표지 인자인 osteocalcin, bone sialoprotein의 발현을 유도하는 것으로 보고되어(Nurminskaya 등, 2003), 고농도 세포외칼슘에 의한 tgm3의 발현 저하는 조골세포 분화를 억제하는 결과를 나타

낼 것으로 생각된다.

고농도세포외 칼슘과 VD3에 의해 다수의 유전자들이 공통적으로 발현이 증가하거나 감소한 기전은 명확하지는 않으나 두 가지 처리 모두 세포내 칼슘농도를 증가시키는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으므로 세포내 칼슘 증가를 통한 신호전달시스템이 이러한 유전자 조절에 관여할 가능성이 있을 것으로 생각된다(Baran 등, 1992; Tsai 등, 2004). 그러나 두 가지 처리 모두 고유의 수용체를 통한 독립적 작용기전이 있으므로 그를 통한 작용도 배제할 수 없으며 이러한 작용을 통해 또다른 다수의 유전자들이 조절될 것으로 생각된다.

이상의 결과는 고농도 세포외칼슘이 조골세포와 골수세포의 혼합배양에서 공통적으로 파골세포 분화관련 유전자의 발현은 증가시키고, 조골세포 분화/석회화 관련 유전자의 발현은 많은 부분 저해시킴을 시사하였다. 그러나 본 연구에서 사용한 세포배양 시스템은 파골세포 분화를 유도하는 시스템이므로 대표적 조골세포 분화표지인자인 alkaline phosphatase, osteocalcin, bone sialoprotein 등의 발현 차이는 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서 조골세포 분화 및 석회화결절 형성 관련 유전자의 발현에 대한 고농도 세포외칼슘의 효과가 조골세포 분화 유도시스템에 그대로 적용될지는 명확하지 않다. 이와 관련하여 VD3를 일차배양된 사람 조골세포에 장시간 처리하면 *cbfa1*의 mRNA 발현을 증가시키고 osteocalcin의 발현도 증가시켜 조골세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있으나(Viereck 등, 2002), 본 연구에서는 VD3에 의해 조골세포분화/석회화를 억제하는 방향으로 관련 유전자의 발현이 조절되었다. 최근에 조골세포가 파골세포 분화에 영향을 미치는 것과 유사하게 파골세포도 역으로 조골세포에 조절작용을 미칠 가능성에 대해 연구가 진행되고 있으며, 본 연구에 사용한 배양조건에는 골수세포가 같이 존재하므로 이를 통한 조골세포 조절작용이 나타났을 가능성도 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(03-PJ1-PG3-20500-0013).

## 참고 문헌

Baran, D.T., Sorensen, A.M., Shalhoub, V., Owen, T., Stein, G., and Lian, J.: The rapid nongenomic actions of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 modulate the hormone-induced increments in osteocalcin gene transcription in osteoblast-like cells. *J. Cell. Biochem.* **50**:124-129, 1992.

- Breckon, J.J., Papaioannou, S., Kon, L.W., Tumber, A., Hembry, R.M., Murphy, G., Reynolds, J.J., and Meikle, M.C.: Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **14**:1880-1890, 1999.
- Brown, E.M. and MacLeod, R.J.: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**:239-297, 2001.
- Canalis, E., McCarthy, T., and Centrella, M.: Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* **81**:277-281, 1988.
- Chang, E., Lee, Z., and Kim, H.: Proteomic identification of the increase in creatine kinase brain isoform expression during osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **19**(suppl.1):SU320, 2004.
- Duarte, W.R., Iimura, T., Takenaga, K., Ohya, K., Ishikawa, I., and Kasugai, S.: Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**:416-420, 1999.
- Duarte, W.R., Shibata, T., Takenaga, K., Takahashi, E., Kubota, K., Ohya, K., Ishikawa, I., Yamauchi, M., and Kasugai, S.: S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **18**:493-501, 2003.
- Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, D.T., Carter, D.H., Dallas, S.L., Nemeth, E.F., and Riccardi, D.: Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:5140-5145, 2004.
- Erickson-Miller, C.L., Freeman, S.D., Hopson, C.B., D'Alessio, K.J., Fischer, E.I., Kikly, K.K., Abrahamson, J.A., Holmes, S.D., and King, A.G.: Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes. *Exp. Hematol.* **31**:382-388, 2003.
- Fukuoka, H., Aoyama, M., Miyazawa, K., Asai, K., and Goto, S.: Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation via increasing IGF2 production by non-osteoclastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**:885-894, 2005.
- Godwin, S.L. and Soltoff, S.P.: Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **272**:11307-11312, 1997.
- Graves, D.T., Jiang, Y., and Valente, A.J.: The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. *Front. Biosci.* **4**:D571-580, 1999.
- Ha-Vinh, R., Alanay, Y., Bank, R.A., Campos-Xavier, A.B., Zankl, A., Superti-Furga, A., and Bonafe, L.: Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *Am. J. Med. Genet. A.* **131**:115-120, 2004.
- Heath, D.J., Downes, S., Verderio, E., and Griffin, M.: Characterization of tissue transglutaminase in human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **16**:1477-1485, 2001.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Riggs, B.L.: The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone

- resorption. *J. Bone Miner. Res.* **15**:2-12, 2000.
- Holliday, L.S., Welgus, H.G., Hanna, J., Lee, B.S., Lu, M., Jeffrey, J.J., and Gluck, S.L.: Interstitial collagenase activity stimulates the formation of actin rings and ruffled membranes in mouse marrow osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.* **72**:206-214, 2003.
- Hong, M.H., Jin, C.H., Sato, T., Ishimi, Y., Abe, E., and Suda, T.: Transcriptional regulation of the production of the third component of complement (C3) by 1 alpha,25-dihydroxy-vitamin D3 in mouse marrow-derived stromal cells (ST2) and primary osteoblastic cells. *Endocrinology* **129**:2774-2779, 1991.
- Huang, Z., Cheng, S.L., and Slatopolsky, E.: Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**:21351-21358, 2001.
- Inoue, D., Kido, S., and Matsumoto, T.: Transcriptional induction of FosB/DeltaFosB gene by mechanical stress in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **279**:49795-49803, 2004.
- Jaubert, J., Jaubert, F., Martin, N., Washburn, L.L., Lee, B.K., Eicher, E.M., and Guenet, J.L.: Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:10278-10283, 1999.
- Kameda, T., Mano, H., Yamada, Y., Takai, H., Amizuka, N., Kobori, M., Izumi, N., Kawashima, H., Ozawa, H., Ikeda, K., Kameda, A., Hakeda, Y., and Kumegawa, M.: Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**:419-422, 1998.
- Kim, M.S., Day, C.J., and Morrison, N.A.: MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J. Biol. Chem.* **280**:16163-16169, 2005.
- Kim, Y.H., Kim, J.M., Kim, S.N., Kim, G.S., and Baek, J.H.: p44/42 MAPK activation is necessary for receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand induction by high extracellular calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:729-735, 2003.
- Komarova, S.V., Dixon, S.J., and Sims, S.M.: Osteoclast ion channels: potential targets for antiresorptive drugs. *Curr. Pharm. Des.* **7**:637-654, 2001.
- Kukita, T., Wada, N., Kukita, A., Kakimoto, T., Sandra, F., Toh, K., Nagata, K., Iijima, T., Horiuchi, M., Matsusaki, H., Hieshima, K., Yoshie, O., and Nomiyama, H.: RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* **200**:941-946, 2004.
- Kurata, M., Hirata, M., Watabe, S., Miyake, M., Takahashi, S.Y., and Yamamoto, Y.: Expression, purification, and inhibitory activities of mouse cytotoxic T-lymphocyte antigen-2alpha. *Protein Expr. Purif.* **32**:119-125, 2003.
- Kusano, K., Miyaura, C., Inada, M., Tamura, T., Ito, A., Nagase, H., Kamoi, K., and Suda, T.: Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* **139**:1338-1345, 1998.
- Lean, J.M., Murphy, C., Fuller, K., and Chambers, T.J.: CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J. Cell. Biochem.* **87**:386-393, 2002.
- Nurminskaya, M., Magee, C., Faverman, L., and Linsenmayer, T.F.: Chondrocyte-derived transglutaminase promotes maturation of preosteoblasts in periosteal bone. *Dev. Biol.* **263**:139-152, 2003.
- Oba, Y., Lee, J.W., Ehrlich, L.A., Chung, H.Y., Jelinek, D.F., Callander, N.S., Horuk, R., Choi, S.J., and Roodman, G.D.: MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* **33**:272-278, 2005.
- Okamoto, Y., Kim, D., Battaglini, R., Sasaki, H., Spate, U., and Stashenko, P.: MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF- $\kappa$ B-ligand-induced osteoclast formation and survival. *J. Immunol.* **173**:2084-2090, 2004.
- Pischon, N., Darbois, L.M., Palamakumbura, A.H., Kessler, E., and Trackman, P.C.: Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor- $\alpha$  in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **279**:30060-30065, 2004.
- Quinn, J.M.W., Elliot, J., Gillespie, M.T., and Martin, T.J.: A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* **139**:4424-4427, 1998.
- Ruchon, A.F., Marcinkiewicz, M., Ellefsen, K., Basak, A., Aubin, J., Crine, P., and Boileau, G.: Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides. *J. Bone Miner. Res.* **15**:1266-1274, 2000.
- Sato, T., Abe, E., Jin, C.H., Hong, M.H., Katagiri, T., Kinoshita, T., Amizuka, N., Ozawa, H., and Suda, T.: The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. *Endocrinology* **133**:397-404, 1993.
- Schilling, A.F., Schinke, T., Munch, C., Gebauer, M., Niemeier, A., Priemel, M., Streichert, T., Rueger, J.M., and Amling, M.: Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* **20**:274-282, 2005.
- Schmid, C., Ghirlanda-Keller, C., and Gosteli-Peter, M.: Ascorbic acid decreases neutral endopeptidase activity in cultured osteoblastic cells. *Regul. Pept.* **130**:57-66, 2005.
- Shin, M.M., Kim, Y.H., Kim, S.N., Kim, G.S., and Baek, J.H.: High extracellular Ca<sup>2+</sup> alone stimulates osteoclast formation but inhibits in the presence of other osteoclastogenic factors. *Exp. Mol. Med.* **35**:167-174, 2003.
- Stains, J.P., Weber, J.A., and Gay, C.V.: Expression of Na(+)/Ca(2+) exchanger isoforms (NCX1 and NCX3) and plasma membrane Ca(2+) ATPase during osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **84**:625-635, 2002.
- Suda, M., Tanaka, K., Fukushima, M., Natsui, K., Yasoda, A., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Itoh, H., and Nakao, K.: C-Type Natriuretic peptide as an autocrine/paracrine regulator of osteoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**:1-6, 1996.
- 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**:345-357, 1999.
- Sugimoto, T., Kanatani, M., Kano, J., Kaji, H., Tsukamoto, T., Yamaguchi, T., Fukase, M., and Chihara, K.: Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **8**:1445-1452, 1993.
- Takami, M., Takahashi, N., Udagawa, N., Miyaura, C., Suda, K., Woo, J.T., Martin, T.J., Nagai, K., and Suda, T.: Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* **141**:4711-4719, 2000.
- Tanji, K., Mori, F., Imaizumi, T., Yoshida, H., Matsumiya, T., Tamo, W., Yoshimoto, M., Odagiri, H., Sasaki, M., Takahashi, H., Satoh, K., and Wakabayashi, K.: Upregulation of  $\alpha$ -synuclein by lipopolysaccharide and interleukin-1 in human macrophages. *Pathol. Int.* **52**:572-527, 2002.
- Thapa, N, Kang K, and Kim I:  $\beta$ g-h3 mediates osteoblast adhesion and inhibits differentiation. *Bone* **36**:232-242, 2005.
- Tsai, J.A., Bucht, E., Topping, O., and Kindmark, H.: Extracellular calcium increases free cytoplasmic calcium and DNA synthesis in human osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* **6**:22-26, 2004.
- Uzawa, K., Grzesik, W.J., Nishiura, T., Kuznetsov, S.A., Robey, P.G., Brenner, D.A., and Yamauchi, M.: Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **14**:1272-1280, 1999.
- Valverde, P., Kawai, T., and Taubman, M.A.: Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J. Bone Miner. Res.* **19**:155-164, 2004.
- Viereck, V., Siggelkow, H., Tauber, S., Raddatz, D., Schutze, N., and Hufner, M.: Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **86**:348-356, 2002.
- Whyte, M.P., Chines, A., Silva, D.P. Jr., Landt, Y., and Ladenson, J.H.: Creatine kinase brain isoenzyme (BB-CK) presence in serum distinguishes osteopetroses among the sclerosing bone disorders. *J. Bone Miner. Res.* **11**:1438-1443, 1996.
- Yamaguchi, T., Kifor, O., Chattopadhyay, N., and Brown, E.M.: Expression of extracellular calcium(Ca<sup>2+</sup>o)-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**:753-757, 1998.
- Yamauchi, M., Yamaguchi, T., Kaji, H., Sugimoto, T., and Chihara, K.: Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**:E608-E616, 2005.
- Yanaka, N., Akatsuka, H., Kawai, E., and Omori, K.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates natriuretic peptide receptor-C expression in mouse osteoblasts. *Am. J. Physiol.* **275**:E965-E973, 1998.
- Yoshikawa, H., Taniguchi, S.I., Yamamura, H., Mori, S., Sugimoto, M., Miyado, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Shibata, N., and Takahashi, K.: Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* **3**:685-695, 1998.
- Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P., and Osdoby, P.: CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J. Bone. Miner. Res.* **19**:2065-2077, 2004.
- Zhao, H., Laitala-Leinonen, T., Parikka, V., and Vaananen, H.K.: Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **276**:39295-39302, 2001.