SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

이 지 현

SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 지 현

SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 지 현

SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

지도 김 경 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 지 현

이지현의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 참 많은 분들께 마음의 빚을 졌습니다. 먼저 시종일관 세심한 조언과 격려를 베풀어주신 김경호 교수님과 신동민 교수님께 진심으로 감사드리며, 아낌없는 지도편달 해주신 박영철 학장님, 이승일 교수님, 최광철 교수님, 서정택 교수님, 그리고 처음 교정학을 공부하는데 있어서 도움을 주신 유영규 교수님, 손병화 교수님, 백형선 교수님, 황충주 교수님, 유형석 교수님, 이기준 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

아울러 본 논문과 실험에 많은 도움을 주신 구강 생리학 교실의 조해 선생님께 감사드리며, 늘 웃는 얼굴로 반갑게 맞아주고 붙임성 없는 저를 한 식구처럼 대해준 구강 생리학, 약리학 교실원들께도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 살아가는데 있어서 힘의 원천이 되는 사랑하는 남편과 귀염둥이 딸 하영이 그리고 항상 저를 믿고 후원해주시며 지금 이 순간 가장 기뻐하실 아버지, 어머니, 아버님, 어머님께 무한한 감사의 말과 함께 이 작은 결실을 바칩니다.

2006년 6월

저자 씀

차 례

그림 차례 ····· vii
국문요약 ····· ix
Ⅰ. 서 론 ····· 1
Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 7
1. 실험재료 ····· 7
2. 실험방법 ····· 7
가. 세포배양 ····· 7
나. 세포내 칼슘 농도 측정 ····· 9
다. 파골세포로의 분화유도 및 TRAP 염색 ····· 9
라. 면역반응염색 ····· 10
마. 면역형광염색 ····· 10
바. 파골세포의 활성도 측정 ····· 11
사. 골밀도의 측정 ····· 11
아. 통계학적 분석 ····· 12
Ⅲ. 결 과 ····· 13
1. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐와 대조 생쥐의 대퇴골에서 골밀도 측정 ····· 13
2. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐와 대조 생쥐로부터 분리된 파골세포 전구세포에서의 칼슘신호 ····· 16
3. 파골세포 분화제인 RANKL 처리 후 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호 ····· 18
4. 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 SERCA 및 PMCA 단백의 발현 ····· 20
5. RANKL 처리 후 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서 NFATc1의 발현 및 핵 내로의 이동 ····· 22
6. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포로부터 분화된 다핵세포의 형성량과 골흡수 능력 ····· 24
Ⅳ. 고 찰 ····· 27

Ⅴ. 결 론 ····· 31
참고문헌 ····· 33
영문요약 ····· 39

그림 차례

Fig. 1. RANKL-induced signaling pathways and the role of Ca^{2+} signaling in osteoclastogenesis. ····· 5

Fig. 2. The role of SERCA in the Ca^{2+} signaling complex. ····· 6

Fig. 3. SERCA2 gene targeting strategy and Genotyping analysis. ····· 8

Fig. 4. Bone morphology and bone density of $SERCA2^{+/-}$ mice compared to wild-type. ····· 14

Fig. 5. Bone density analysis of $SERCA2^{+/-}$ mice compared to wild-type. ····· 15

Fig. 6. Measurement of Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx in BMMs from $SERCA2^{+/-}$ and wild-type mice. ····· 17

Fig. 7. Ca^{2+} oscillations before and after 48hrs of RANKL stimulation in osteoclast precursor cells from $SERCA2^{+/-}$ and wild-type mice. ····· 19

Fig. 8. Expression of Ca^{2+} signaling proteins by RANKL stimulation. ····· 21

Fig. 9. NFATc1 expression and nuclear translocation stimulated by RANKL. ····· 23

Fig. 10. Differentiation into multinucleated osteoclasts by RANKL stimulation. ····· 25

Fig. 11. Bone resorbing activity of osteoclasts. ····· 26

국 문 요 약

SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

분화된 파골세포는 뼈에서 칼슘을 재 흡수하여 혈장내의 칼슘농도를 변화시켜 뼈를 재구성 하게 된다. 조골세포에서 분비된 receptor activator of NFκB ligand (RANKL)는 전구세포로부터 파골세포 분화를 유도한다. RANKL 신호는 전구세포 내 TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)를 시작으로 NFκB, c-Fos, JNK, 그리고 ERK와 같은 다양한 신호전달기전을 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 최근 칼슘 신호가 최종적인 분화 단계 과정에서 발생함이 밝혀졌다. 칼슘신호는 세포내 칼슘 농도의 증가와 감소를 통해 나타난다. 그러나 아직까지 파골세포 전구세포에서 칼슘 신호의 변동이 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 정확히 알려진 바가 없다. 칼슘신호 관련 단백 중 하나인 sarco/endoplasmic recticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2)는 세포내 칼슘 농도를 낮게 유지하는 역할을 수행한다. 본 연구자는 SERCA2를 발현시키는 유전자인 *ATP2A2* 중 하나를 결여시킨 SERCA2 이형접합자 생쥐 ($SERCA2^{+/-}$)에서 골밀도의 증가를 확인하였다. 이에 본 연구에서는 SERCA2 이형접합자 생쥐에서 분리된 파골세포 전구세포에서 SERCA2의 발현 저하가 파골세포 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는 지를 세포생리학적, 생화학적 방법을 통해 알아보고자 하였다.

$SERCA2^{+/-}$와 대조 생쥐에서 분리된 파골세포 전구세포에서 칼슘 dye인 Fura2의 형광정도를 세포내 칼슘농도로 간주하여 측정 비교하였고, 파골세포 분화 과정에 관여하는 단백들의 발현과 활성도를 면역반응법과 면역형광염색법으로 확인하였으며, RANKL에 의한 파골세포 분화정도를 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색법과 pit assay를 통해 확인하였다.

미세 컴퓨터 단층촬영과 골 염색법을 통해 $SERCA2^{+/-}$에서는 대조 생쥐에 비해 약 50% 정도 골밀도가 증가하였다. $SERCA2^{+/-}$ 파골세포 전구세포에서 SERCA를

억제하여 측정된 소포체내 칼슘의 양은 대조군에 비해 감소하였으며, 효현제 자극 시 유리되는 칼슘 농도 역시 대조군에 비해 감소하였으나, 소포체내 칼슘 고갈에 따른 칼슘 유입량은 대조군과 실험군간 차이가 없었다. 파골세포 분화제인 RANKL 처치 시 대조 전구세포에서는 약 24시간에서 72시간까지 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화 ($[Ca^{2+}]_i$ oscillations)가 관측되었으나, SERCA2$^{+/-}$에서는 칼슘신호가 관찰되지 않았다. 대조군에 비해 SERCA2$^{+/-}$에서는 SERCA의 발현이 감소하였으며, plasma membrane Ca^{2+} ATPase의 발현은 동일하였다. RANKL 처리 후 48시간에서 칼슘신호에 의해 활성화되는 nuclear factor of activated T cell (NFATc1)의 발현 양과 NFATc1의 핵 내로의 이동이 SERCA2$^{+/-}$에서 감소하였다. RANKL 처리 6일 후에 SERCA2$^{+/-}$에서는 다핵세포로의 분화가 현저히 감소하였으며, 다핵세포 형성 인식표지인 actin ring의 형성이 거의 발생하지 않았다. 더불어 SERCA2$^{+/-}$에서는 골흡수 능력이 약 70% 정도 감소하였다. 이상의 결과는 기존에 알려진 RANKL 신호전달 경로에서 칼슘신호의 활성화가 파골세포 분화과정에 필수적인 신호임을 의미하며, 이와 연관된 향 후 연구는 파골세포 분화과정의 생리적 이해에 필요하다고 판단된다.

핵심 되는 말: 파골세포, RANKL, SERCA2, SERCA2 이형접합자 생쥐, 칼슘신호 전달

SERCA2 발현 저하가 파골세포 분화에 미치는 영향

<지도교수 김 경 호>

연세대학교 대학원 치의학과

이 지 현

I. 서 론

파골세포(osteoclast)는 골흡수 능력을 보이는 특수한 세포로서 조골세포(osteoblast)와 연계하여 혈장 내 칼슘이온의 항상성을 유지하고 성장기 아동의 골격 성장 그리고 성인에서 평생 동안 지속적으로 일어나는 골개조시 중심적인 역할을 담당한다. 골개조에 의해 골은 지속적으로 새로운 골조직으로 대체되는데 (Manolagas, 2000) 이 과정의 균형에 문제가 발생하면, 관절염, 치주염 등의 질환을 일으키고, 골다공증 및 골경화증과 같이 골 구조에도 영향을 미치게 된다 (Helfrich, 2003). 한편, 교정적 치아 이동은 기계적 자극에 대한 치주인대 세포 및 치조골내 여러 세포들의 반응으로 치조골개조가 일어나는 현상인데 예로부터 압박 부위에서의 골흡수와 인장 부위에서의 골침착으로 설명되어왔다 (Reitan, 1960, 1964; Storey, 1973). 이때 일어나는 조직학적 변화 및 세포내 kinetics에 대한 연구는 있었으나 (Smith와 Roberts, 1980; Roberts 등, 1981), 세포 및 분자생물학적 수준의 연구는 아직 미흡한 상황이다. 특히 파골세포에 의한 골조직의 흡수가 치아이동 속도를 결정짓는 중요 인자임을 감안할 때 (Roberts, 2000) 파골 세포의 분화 기전에 대한 이해는 교정치료에 있어서 필수적이다.

파골세포는 단핵/대식세포 계열의 조혈세포 전구세포로부터 기원한다. 파골세포가 골조직에 부착하여 산과 여러 종류의 분해효소를 분비하는 다핵의 거대세포가 되기 위해서는 일련의 분화과정을 거쳐야 한다. 이 과정은 1) 조혈기관에서 파골세포 전구세포 (osteoclast progenitor)의 증식 2) 골흡수 부위로의 이동 3) commited osteoclast로의 분화 4) 다핵 거대세포로의 융합으로 이루어진다 (Ash 등, 1980; Tran Van 등, 1982). 이러한 파골세포의 분화는 조골세포 전구세포 및 골수 간엽기원세포 (mesenchymal stromal cell)에 의해 조절된다. 조골세포 전구세포 및 골수 간엽기원세포로부터 receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)와 macrophage colony stimulating factor (M-CSF)가 발현되어 파골세포의 분화를 조절한다. M-CSF는 파골세포 전구세포 및 파골세포의 생존 신호를 제공하며, RANKL은 tumor necrosis factor (TNF) 계열의 cytokine으로서 파골세포 전구세포의 RANK 수용체와 결합하여 파골세포의 분화, 다핵 거대세포로의 융합, 활성화 그리고 생존을 위한 신호를 전달하게 된다 (Khosla, 2001; Katagiri와 Takahashi, 2002; Boyle 등, 2003). RANKL-RANK 결합은 세포내 TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)와 c-Fos 신호전달체계를 활성화시켜 궁극적으로 nuclear factor of activated T cell 1 (NFATc1) 전사인자를 활성화 시킨다. NFATc1은 파골세포 분화의 최종 전사 인자로서 자가 증폭 과정을 통해 NFATc1 자체의 전사를 증가시키는 특징이 있으며, AP-1과 함께 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), 칼시토닌 수용체 그리고 cathepsin K 등의 파골세포 특이 유전자의 발현을 유도한다 (Takayanaki 등, 2002, 2005) (그림 1).

현재 전 세계적으로 파골세포의 분화와 관련되어 연구되고 있는 경향은 RANKL이 파골세포와 결합하여 TRAF6, JNK, 그리고 NF-κB 까지 이어지는 신호전달 기전에 대한 연구에 집중되고 있다. 이는 RANKL이 전구세포와 결합된 후 주로 24시간 안에 이루어지는 기전이다. 그러나 여러 전사인자가 핵 내로 들어가 다양한 유전자 발현을 조절한 이후 즉, 분화 중기 (24시간) 이후에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 다만, 최근 분화 중기 이후 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화 (Ca^{2+} oscillation), 즉 칼슘신호가 관찰되었으며, 칼슘신호가 calcineurin (Ca^{2+}/calmodulin 의존성 탈인산화 효소)과 이하 신호전달계인 NFATc1의 활성을 조절함으로써 최

종적인 분화 단계에 관여함이 밝혀졌다 (Takayanaki 등, 2002, 2005; Koga 등 2004). 현재 칼슘신호는 파골세포 분화과정의 필수적인 신호전달체계로 인식되고 있는데, 특히 세포내 칼슘 치환제로 파골세포 전구세포를 처리하면 분화과정이 억제되었다는 결과는 칼슘신호가 파골세포 분화과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사 한다 (Takayanaki 등, 2002).

세포내 자유칼슘이온은 주로 호르몬이나 신경 전달 물질에 의해 증가되는데, 증가된 세포내 칼슘이온은 유전자 발현, 성장과 분화, 외분비액의 분비, 근육수축, 신경물질의 전달, 기억과 학습 등의 다양한 생체 내 반응을 조절 한다 (Berridge 등, 2003). 세포내 칼슘이온 농도는 기저상태에서 세포외부에 비해 1/10,000정도의 낮은 수준으로 유지되다가 외부 신호가 전달되면 세포내 농도가 증가한 후 calmodulin 등 칼슘 결합 단백들과 결합하여 단백질 인산화 효소와 단백질 탈인산화 효소의 활성도를 조절한다. 특히 파골세포 분화 과정에서 칼슘신호는 탈인산화 효소인 calcineurin의 활성화를 매개로 NFATc1의 활성화에 중요한 역할을 한다 (Takayanaki 등, 2002, 2005; Koga 등 2004). 이 때 칼슘신호는 칼슘 oscillation이라는 독특한 형태로 나타나는데, 이는 세포내 칼슘 농도의 증가와 감소가 반복되는 현상이다. 일반적으로 비흥분성세포에서 세포내 칼슘 농도의 증가는 세포내 칼슘의 저장소인 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)에서의 칼슘 유리와 세포외부로부터의 칼슘 유입에 의하며, 세포내 칼슘의 감소는 칼슘완충 단백들과 소포체막 칼슘펌프 (sarco/endoplasmic Ca^{2+} ATPase, SERCA), 세포막 칼슘펌프 (plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA)와 같은 칼슘 펌프에 의한다 (Kiselyov 등, 2003; Shin 등, 2003) (그림 2).

파골세포 분화 과정에서 칼슘 신호 발생은 다양한 면역 수용체 및 RANKL-RANK 상호작용에 의한 immunoreceptor tyrosine-based activation motif-harbouring adaptor (ITAM)의 인산화로부터 시작되는 것으로 알려져 있다 (Koga 등, 2004; Takayanaki 등, 2005). ITAM은 phospholipase Cɣ (PLCɣ)를 활성화시키며 PLCɣ는 세포막에 존재하는 phophatidyl-inositol-diphosphate (PIP2)를 가수분해하여 inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3)가 증가하며, 증가된 IP_3는 세포내 칼슘저장고로 알려진 소포체의 IP_3 수용체 (IP_3R)의 칼슘투과도를 변화시켜 세포

질로의 칼슘유리를 촉진시킨다. 더불어 소포체로부터의 칼슘 유리에 따른 고갈은 세포막에 존재하는 칼슘저장고 의존성 칼슘 이온통로 (store-operated Ca^{2+} channel, SOCC)의 전도도를 변화시켜 세포외부의 고농도의 칼슘을 세포내로 유입시키도록 한다 (Kiselyov 등, 2003). 이와 같이 세포내 증가된 칼슘이온은 칼슘펌프에 의해 제거되는데, SERCA는 칼슘이온을 소포체로 유입시킴으로써 세포내 칼슘농도를 낮게 유지하는 역할을 수행한다. SERCA는 1, 2 그리고 제 3아형으로 분류되는데 (Wuytack과 Raeymaekers, 1992; Verboomen 등 1992, 1994) 그 중에서 SERCA 제 2아형 (SERCA2)은 거의 모든 세포에서 발현되며 가장 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다 (Gunteski-Hamblin 등, 1988).

SERCA2는 칼슘신호와 연관된 주요 단백으로 *ATP2A2* 유전자에 의해 발현된다. *ATP2A2* 유전자 중 하나를 결여시킨 실험동물 모델인 SERCA2 이형접합자 생쥐 ($SERCA2^{+/-}$)에서 본 연구자는 골밀도의 증가를 확인하였다. 이에 SERCA2가 칼슘신호와 골개조에 관여할 가능성이 있어, 본 연구에서는 SERCA2 이형접합자 생쥐에서 분리된 파골세포 전구세포에서 SERCA2의 발현 저하가 파골세포 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는지를 세포생리학적, 생화학적 방법을 통해 알아보고자 하였다.

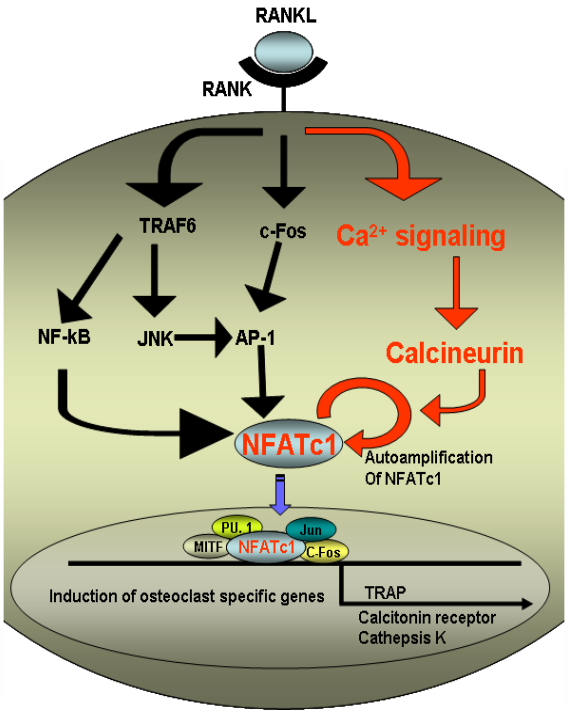

Fig. 1. RANKL-induced signaling pathways and the role of Ca^{2+} signaling in osteoclastogenesis. RANKL-RANK interaction results in NFATc1 activation via the c-Fos and TRAF6 signaling pathways. Recent studies have revealed that Ca^{2+} signaling mediated by calcineurin is critical for NFATc1 activation. NFATc1 leads to the induction of osteoclast specific genes during the terminal differentiation of osteoclasts. (RANKL, receptor activator of NF-κB ligand; NFATc1, nuclear factor of activated T cell; TRAF6, TNFR-associated cytoplasmic factor)

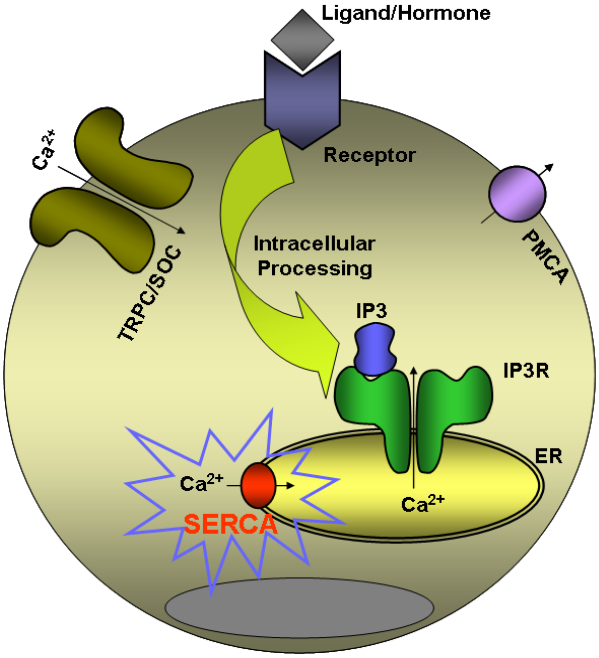

Fig. 2. The role of SERCA in the Ca^{2+} signaling complex. Binding of an external signaling molecule to a receptor leads to a cascade of intracellular signaling which induces IP_3 formation. IP_3 induces $[Ca^{2+}]_i$ increase via release of Ca^{2+} from ER and Ca^{2+} entry through a Ca^{2+} channel. SERCA and PMCA pumps remove Ca^{2+} from the cytosol to reduce $[Ca^{2+}]_i$ back toward resting levels. (SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; IP_3, inositol 1,4,5-triphosphate; PMCA, plasma membrane Ca^{2+} ATPase)

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

미국 Cincinnati 의과대학의 Garry E. Shull 박사의 실험실로부터 제공받은 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐를 교배시켜 태어난 후 2주가 되었을 때 유전자 검사 후 실험군인 SERCA2$^{+/-}$생쥐와 대조 생쥐로 분류하여 생쥐가 태어난지 4주가 되었을 때 파골세포 전구세포(bone marrow derived monocyte/macrophage precursor cells)를 각 각의 생쥐 대퇴골에서 분리하여 사용하였다 (그림 3). RANKL은 KOMA Biotech. Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 α-MEM 배지 및 FBS는 GIBCO/BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining kit, toluidine-blue 그리고 phalloidin 항체는 Sigma Chemical Co., Ltd (St. Louis, MO)에서 구입하였다. ERK 다중항체, phospho-ERK 다중항체, JNK 다중항체, phospho-JNK 다중항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, PMCA 단일항체는 Transduction Laboratory (San Jose, CA, USA)에서, NFATc1 다중항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA)에서 구입하였다. 그리고 IP_3R3 다중항체는 Tanimura 박사 (일본, 호카이도 치과대학)로부터 제공받았다. Fura-2/AM과 pluonic F-127은 Molecular probe (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

가. 세포 배양

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포는 5% CO2와 95% air가 지속

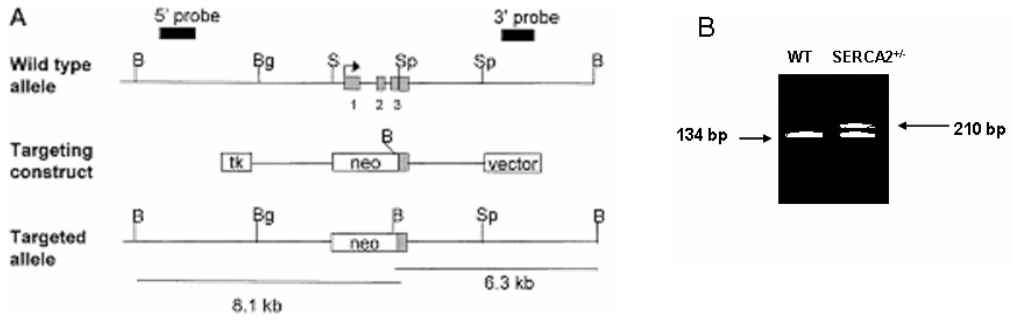

Fig. 3. SERCA2 gene targeting strategy and Genotyping analysis. (A) Top, restriction map of wild-type allele including 3 kinds of exons. Middle, targeting construct in which 1.5 kb of SERCA2 genomic sequence, containing exons 1 and 2 and part of exon 3, was replaced by the neo gene. The herpes simplex virus thymidine kinase gene was placed 5′ to the SERCA genomic sequence. Bottom, targeted SERCA2 allele, with BamHI restriction fragments identified by 5′ and 3′ probes indicated below. Restriction enzyme sites: B, BamHI; Bg, BglII, Sp, SpeI; S, SacI. (Adapted from Periasamy M et al *J Biol Chem* 274: 2556-2562, 1999). (B) Genotyping analysis of tail DNA from offspring of SERCA2$^{+/-}$ matings. Left band indicates wild-type gene. Right bands, which include two bands, indicate SERCA2$^{+/}$ gene.

적으로 제공되는 37°C 세포배양기에서 10% FBS와 1% antibiotics를 포함하고 있는 α-MEM 배지로 배양하였다. 최초 분리 시 100mm 배양접시에 M-CSF(10ng/ml) 와 함께 하루 동안 초기 배양 후, 다시 실험 목적에 맞는 배양접시로 분주한 후, 48시간 이후에 RANKL (50ng/ml)과 M-CSF (50ng/ml)를 처리한 후 사용하였다 (단, 각 각의 대조군은 M-CSF 만 처리하였으며, RANKL은 처리하지 않았다). 배지 교체 시에는 항상 RANKL과 M-CSF의 양은 50ng/ml로 일정하게 유지하였으며, 각 각의 세포는 동일한 조건과 환경 하에서 배양하였다.

나. 세포 내 칼슘 농도의 측정

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포에 RANKL과 M-CSF 처리 시 35 mm 배양 접시에 유리로 된 cover-slip (22 x 22)을 올려놓은 뒤, 배양 접시 당 2 X 10^5개의 세포를 분주 하였다. 그로부터 48시간 이후에 배지 제거 후 PSS (physiological salt solution, 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10mM HEPES, 10mM glucose, pH7.4, 310mOsm)에 Fura-2/AM을 5μM의 농도로 실온에서 40분간 세포 내에 축적하였다. 340nm와 380nm의 두 파장으로 세포 내 Fura-2/AM을 활성화 시켰으며, 510nm의 파장으로 칼슘을 측정하였다. 두 파장으로부터 활성화 된 값은 각 각의 파장값에서 다음과 같은 계산을 거친 이 후 적용되었다.

$$(\text{Ratio} = F_{340}/F_{380})$$

세포로부터 나오는 형광은 현미경에 부착되어져 있는 CCD (Photon Technology International Inc, Lawrencevile, NJ)카메라로 측정하였으며 2초 당 한 장씩 30분간 측정되었다 (Hong 등, 2004).

다. 파골세포로의 분화 유도 및 TRAP 염색

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포를 48 well plate에 well당 5 x 10^4의 수로 분주 한 뒤 48시간이 지난 이후 RANKL과 M-CSF를 처리 하였다.

6일이 지난 뒤, 파골세포로의 분화를 확인하기 위하여 TRAP 염색을 실시하였다. TRAP (파골세포의 표지 단백질) 염색은 leukocyte acid phosphate assay kit (Sigma Chemical Co., Ltd St. Louis, MO)을 이용하여 수행하였다.

라. 면역반응검색

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구 세포를 60mm 배양접시에 분주한 뒤 이틀 후 RANKL과 M-CSF을 처리하고 원하는 시간동안 배양하였다. Lysis buffer (20 mM Tris, pH7.4, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% Triton-X100, 0.01 mg/ml aprotinin, 0.005 mg/ml leupeptin, 0.4 mM PMSF, and 4 mM NaVO4)를 이용하여 정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포로부터 전체 단백질을 원심분리를 통해 추출하였다. Well 당 50 - 100ug의 동량 단백질을 전기영동법을 사용하여 8% SDS-page gel에서 크기별로 분리 하였다. 분리 된 단백질들을 nitrocellulose membrane에 전기적으로 이동시킨 다음 6% skim milk를 사용하여 blocking과정을 거친 후, NFATc1 (1:1000), total-ERK (1:1000), phospho-ERK (1:1000), total-JNK (1:1000), phospho-JNK (1:1000), 그리고 NF-κB p65 (1:1000)의 항체를 이용하여 blotting하였으며, 이후 HRP-conjugated 이차항체를 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 뒤, chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였으며, 발현 정도는 Meta Morph Program를 이용하여 측정하였다.

마. 면역형광 염색

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포를 poly-L-lysine 코팅 되어있는 얇은 유리판 (22 x 22)위에 분주 한 뒤 다음날 RANKL과 M-CSF를 처리하고 원하는 시간동안 배양하였다. 4% paraformaldehyde (PFA)를 20분간 처리하여 세포를 고정시킨 이후 0.2% Triton X-100을 5분간 처리하였다. 이후 5% goat serum이 들어있는 blocking solution (0.1% gelatin, 1% BSA, 0.01% Na azide)을

30분간 처리하고, NFATc1 단일 항체를 세포에 처리하여 세포 내부의 NFATc1을 표지 하였다. 이어서 Alexa 488-labeled IgG antibody (Molecular Probe) 이차항체와 함께 4℃에서 24시간 배양 후, PBS로 1회 세척 후 4′-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 처리하여 1회 세척했다. 이후에 PBS만으로 1회 세척 후, mounting media로 슬라이드 글라스에 고정시킨 후 24시간이 지난 후 confocal microscope (Leica TCSNT)으로 형광을 관찰하였다. 단, 파골세포의 actin ring 형성을 알아보기 위해 처리한 phalloidin 항체의 경우, phalloidin 항체만을 세포에 처리하여 세포 내부의 actin을 표지 하였으며, 이차항체의 처리 없이 세척 후 즉시, mounting media로 슬라이드 글라스에 고정시킨 후 24시간 이후에 confocal microscope으로 형광을 관찰하였다.

바. 파골세포의 활성도 측정

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포를 최초 분리 시 100mm 배양접시에 M-CSF (10ng/ml) 와 함께 하루 동안 초기 배양 후, 각 각의 세포를 osteoclast activity assay substrate (OAAS, Oscotec, Korea)에 5 x 10^4 수로 분주한 후 48시간 이후 배지 교체 시 RANKL과 M-CSF를 처리한 후 6일 동안 배양하였다. 배양하는 동안 배지는 4일에 한 번씩 교체하였으며, 교체 시 RANKL과 M-CSF 또한 정해진 농도를 유지시켰다. 실험 방법 (가)의 세포 배양 시와 같은 조건에서 배양하였다. 형성된 pit의 사진은 현미경 (Eclipse TE2000-U, Nikon, Japan)에 부착된 디지털 카메라를 이용하여 20배의 배율에서 촬영되었다. pit의 면적은 MMP를 이용하여 측정하였다.

사. 골밀도의 측정

사-1. Toluidine-blue 염색법

정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골을 분리한 후, 4% paraformaldehyde에 30

일 동안 4℃에서 고정시킨 후, paraffin wax에 embed 하였다. 미세 절편기 (CM3050S, Leica, Germany)를 이용하여 6μm의 두께로 가늘게 썰은 후 Xylen (x2), 100%, 95%, 90%, 80%, 70% (EtOH) 의 순서로 rehydrogenation 시킨 후, Toluidine-blue 시약을 약 30초간 처리 후 rehydrogenation의 역순으로 dehydrogenation 시켰다. Mounting media로 슬라이드 글라스에 고정시킨 후 24 시간 이후에 현미경에 부착된 디지털 카메라에서 10배율로 촬영하였다.

사-2. 미세 단층 촬영에 의한 골밀도 분석법

정상 생쥐와 $SERCA2^{+/-}$ 생쥐의 뒷다리를 절개한 후 대퇴골을 제외한 부분을 제거하였다. 생쥐의 대퇴골을 고정하기 위하여 polystyrene holder를 제작하였으며, 기계 조작중 양 생쥐에서 분리된 대퇴골이 각 각 따로 촬영될 시에 생길 수 있는 threshold 와 resolution의 설정의 차이를 배재하기 위하여 동일 polystyrene holder에 정상 생쥐와 $SERCA2^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골을 각 각 2개씩 삽입한 후 3차원 미세 단층 촬영기 (SkyScan-1076 high-resolution in-vivo micro-CT system, Aartselaar, Belgium)를 이용하여 투과 이미지를 얻었으며, 제조사 소프트 웨어인 Cone beam reconstruction과 CTAn을 이용하여 단층 이미지와 골밀도를 분석하였다. 3 차원 이미지는 단층이미지를 재조합 하여 응용 프로그램을 통하여 얻어졌다.

아. 통계학적분석

Student *t*-test를 실시하여 통계학적으로 분석하였으며, $P<0.05$일 때 유의성 있는 차이로 간주 하였다.

III. 결 과

1. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐와 대조 생쥐의 대퇴골에서 골밀도 측정

파골세포 전구세포의 분화과정에서 RANKL 처리 후 24시간에서 72시간 동안 칼슘 신호전달이 발생한다. 그러나 아직까지 파골세포 전구세포에서 칼슘 신호의 변동이 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 정확히 알려진 바 없으며, 실험동물에서 칼슘신호 변동이 골밀도의 변화에 어떠한 영향을 미치는 지 역시 알려진 바 없다. SERCA 펌프는 칼슘 신호전달계와 밀접한 연관성을 갖는 단백으로, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서는 *ATP2A2* 유전자의 감소로 인한 SERCA2의 발현 저하가 골형성에 영향을 줄 가능성이 있다. 이에 정상 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골의 외형적인 변화와 내부에서의 골밀도의 변화를 확인하였다. 각 각의 생쥐에서 대퇴골을 분리하여 확인해본 결과, 크기나 외형에 커다란 이상을 보이지 않았다 (그림 4A, n=4). 그러나 3차원 미세 단층 촬영기를 통하여 뼈 내부의 골밀도를 이차원 그리고 삼차원적으로 측정해 본 결과, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골에서는 대조 생쥐에 비해 약 1.5배 가량 골밀도가 증가한 것을 확인하였으며 (그림 4B와 5A와 B, 147.87 ± 11.39%, n=4, $P<0.05$), toluidine 시약을 이용해 뼈를 염색해본 결과 또한 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골에서 골밀도가 증가함을 확인하였다 (그림 4C, n=6).

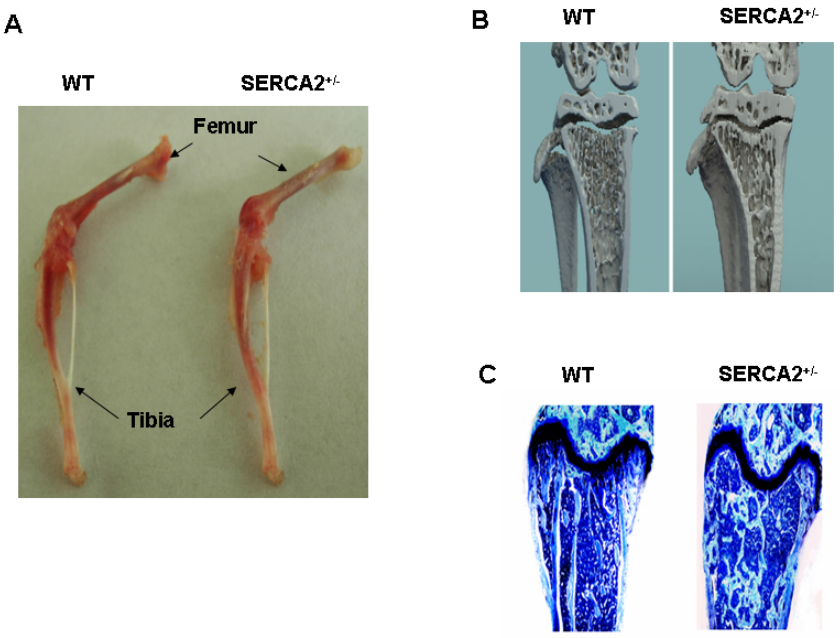

Fig. 4. Bone morphology and bone density of SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type. (A) No difference considering tibial bone length and morphology was found between SERCA2$^{+/-}$ and wild-type mice. However, three dimensional micro-computed tomography (micro-CT) reconstruction (B) and toluidine blue staining (C) showed increased tibial bone density in SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type. Images are representative of 4-6 independent experiments.

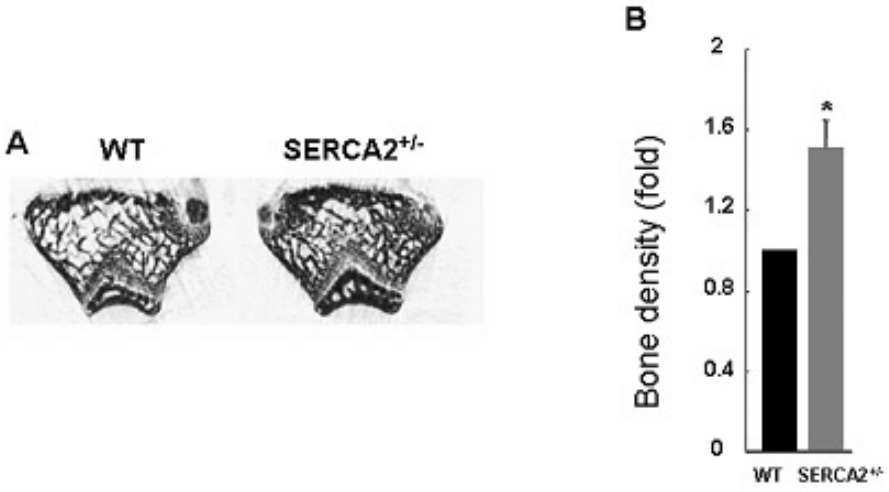

Fig. 5. Bone density analysis of SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type. Two-dimensional micro-CT images were used to compare bone density (A) According to bone density analysis using a software program provided by the manufacturer, SERCA2$^{+/-}$ mice showed a mean 1.5 fold increase in bone density compared to wild-type (B) Results are representative of 4 independent experiments ($P<0.05$).

2. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐와 대조 생쥐로부터 분리된 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호

그림 4와 5에서의 실험쥐와 대조 생쥐 간의 골밀도 차이는 실험쥐의 파골세포 형성 또는 활성의 감소에 의해 나타날 가능성이 있다. 또한 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서 칼슘 신호전달 단백 중 하나인 SERCA2 유전자의 결여는 파골세포 전구세포의 칼슘 신호전달계에 영향을 줄 가능성이 있다. 이에 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐로부터 분리한 파골세포 전구세포에 M-CSF를 선 처리 하여 양 세포를 생존시키면서, 다양한 방법을 통해 양 세포간의 칼슘신호를 비교하였다. 즉, 효현제의 자극에 의한 칼슘 농도의 증가, 소포체내 칼슘의 양과 외부로부터의 칼슘 유입량을 측정하여 양 세포 간의 칼슘신호를 확인하였다. SERCA2$^{+/-}$와 대조 생쥐에서 분리된 파골세포 전구세포에서 칼슘 dye인 Fura2의 형광정도를 세포내 칼슘농도로 간주하였다 (ratio=340/380). SERCA 억제제인 1 μM thapsigargin (Tg)로 SERCA를 저해함과 동시에 G-단백 연계 수용체의 효현제인 ATP 1mM로 동시 자극한 결과 대조 생쥐로부터 분리한 파골세포 전구세포에서의 세포내 칼슘 농도의 최대치는 1.64 ± 0.15이었으며, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐로부터 분리한 파골세포 전구세포에서의 세포내 칼슘 농도는 0.54 ± 0.05이었다 (그림 6A, n=4, $P<0.001$). Tg을 이용하여 소포체내의 칼슘을 완전히 고갈시킨 후, 세포 외부로부터의 칼슘 유입에 따른 세포내 칼슘 농도의 증가는 대조 생쥐로부터 분리한 파골세포는 0.53 ± 0.06이었으며, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐로부터 분리한 전구세포에서는 0.55 ± 0.10이었다 (그림 6B, n=4). 또한 ATP 1mM만으로 자극한 경우 세포내 칼슘 농도의 최대치는 대조 생쥐에서 1.44 ± 0.06, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서 0.97 ± 0.04 이었으며, ATP 존재 하에 외부칼슘 유입에 의한 칼슘 농도의 최대치는 대조 생쥐에서 1.10 ± 0.18, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서는 0.91 ± 0.05이였고, Tg 존재 하에 외부로부터의 칼슘 유입에 따른 농도의 최대치는 대조 생쥐 0.49 ± 0.08, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐는 0.52 ± 0.07이었다 (그림 6C, n=4). 이상의 실험결과는 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서 소포체내의 칼슘의 양과 효현제 자극에 따른 칼슘 농도는 감소한 반면, 외부 유입되는 세포내 칼슘 농도의 증가에는 대조 생쥐와 비교하여 유의성 있는 차이가 없음을 의미한다.

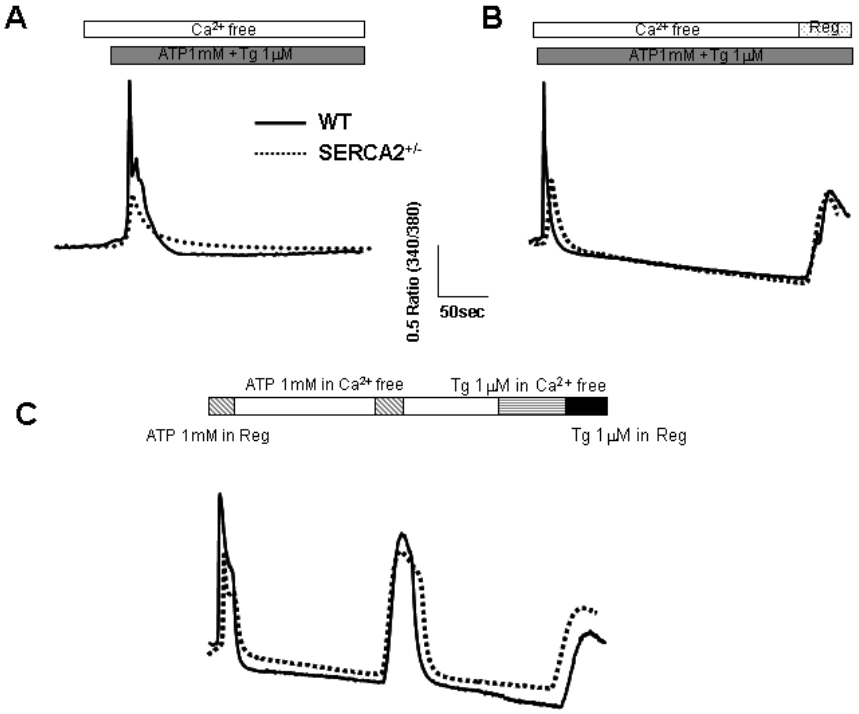

Fig. 6. Measurement of Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx in BMMs from SERCA2$^{+/-}$ and wild-type mice. (A) In order to measure the amount of Ca^{2+} release from ER, BMMs were stimulated by ATP 1mM in the presence of Tg 1μM, a specific SERCA inhibitor. (B) Ca^{2+} influx was measured by initially emptying the ER Ca^{2+} store, treating the cells with ATP 1mM and Tg 1μM in a Ca^{2+}-free medium and then changing it to a regular medium. (C) Intracellular Ca^{2+} level increase followed by ATP stimulation was measured. Then Ca^{2+} influx after ER Ca^{2+} store emptying was measured. Finally, Ca^{2+} influx in the presence of Tg was measured. Results are representative of 4 independent experiments. (BMMs, bone marrow derived monocyte/macrophage precursor cells; ATP, adenosine triphosphate; Tg, thapsigargin; ER, endoplasmic reticulum)

3. 파골세포 분화제인 RANKL 처리 후 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호

그림 6에서 확인된 칼슘신호의 변동은 RANKL 처리 후 유발되는 분화 중기 이후의 칼슘 신호에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이에 RANKL 처리 후 유발되는 양 세포에서의 칼슘 신호를 비교하였다. 대조 생쥐 세포에서는 파골 세포의 분화유도 인자인 RANKL (50ng/ml) 처리 시 24-72시간대에 걸쳐 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화 (Ca^{2+} oscillations)가 유발된다. 본 실험에서는 Ca^{2+} oscillations의 최대치가 나타나는 RANKL 처리 후 48시간에서 대조 생쥐에서는 Ca^{2+} oscillations이 관찰된 반면 (그림 7C), SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서는 RANKL 처리 후 48시간에서도 칼슘 신호가 발생하지 않았으며 (그림 7D), 24와 72시간대에서도 칼슘 신호가 발생하지 않았다 (n=4).

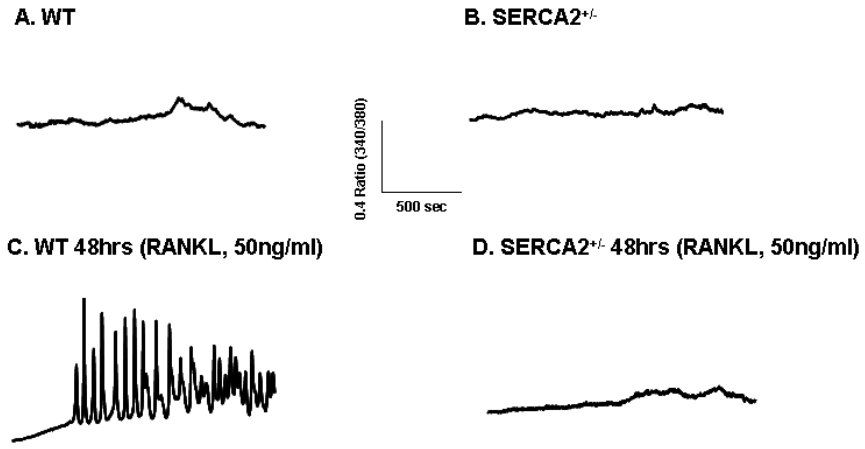

Fig. 7. Ca^{2+} oscillations before (A,B) and after 48hrs (C,D) of RANKL stimulation in osteoclast precursor cells from SERCA2$^{+/-}$ and wild-type mice. Note that Ca^{2+} oscillations are not evoked in SERCA2$^{+/-}$ mice. Results are representative of 4 independent experiments.

4. 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 SERCA 및 PMCA 단백의 발현

그림 7에서의 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호, 즉 Ca^{2+} oscillations의 유도 차이는 그림 4에서의 소포체내의 칼슘의 양의 차이와 더불어, 칼슘 관련 단백들의 발현 변동에 의해 나타날 가능성이 있다. 이에 양 세포에서 RANKL 처리 후 시간대에 따른 칼슘 신호 관련 단백의 발현의 변동을 알아보았다. SERCA2 단백은 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서 RANKL을 처리하지 않았을 때에 대조 생쥐에 비하여 발현 양이 36.69 ± 3.89 % 감소하였으며, RANKL 처리 15분 후에는 34.87 ± 4.33 %, 1시간 후에는 33.90 ± 6.95 %, 2시간 후에는 38.69 ± 2.33%, 48시간 후에는 36.80 ± 3.14 %로 감소하였다. 그러나 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서 각 시간대에 따른 발현 양의 차이는 없었다 (그림 8, n=4). 세포막 칼슘펌프인 PMCA는 RANKL을 처리하지 않았을 때에 대조 생쥐에 비하여 93.23 ± 2.86 % 발현되었으며, RANKL 처리 15분 후 106.46 ± 3.12 %, 1시간 후 102.60 ± 6.26 % , 2시간 후 95.23 ± 1.66 %, 48시간 후 102.99 ± 1.79%로 발현되었다 (그림 8, n=4). PMCA의 단백발현 양 또한 시간대에 따라 차이가 거의 없었으며, 대조군과 거의 유사한 양으로 발현됨을 확인하였다.

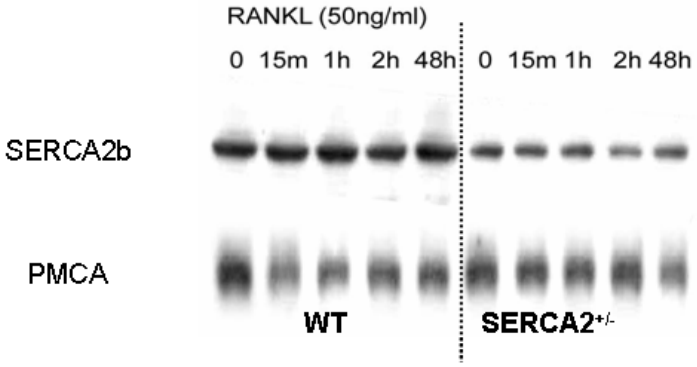

Fig. 8. Expression of Ca^{2+} signaling proteins by RANKL stimulation. No difference in PMCA expression level was found between $SERCA2^{+/-}$ and wild-type mice. However, down regulation of SERCA2b was observed in $SERCA2^{+/-}$ mice compared to wild-type. These results were independent of RANKL stimulation time. The immuno-blotting was the representative of 4 independent experiments.

5. RANKL 처리 후 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서 NFATc1의 발현 및 핵 내로의 이동

파골세포의 분화 중기 이후, 즉 48시간대에 핵 내 전사 인자인 NFATc1의 발현 및 활성을 위한 핵 내로의 이동은 칼슘 신호, 그리고 TRAF6의 활성에 따른 JNK와 ERK의 인산화에 의하여 조절 된다 (Takayanaki 등, 2002, 2005; Koga 등 2004). 따라서 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호의 감소는 NFATc1의 발현 및 활성을 위한 핵 내로의 이동에 영향을 줄 가능성이 있다. 이에 RANKL 처리 후 대조 생쥐와 실험 생쥐 파골세포 전구세포에서 NFATc1의 발현과 활성을 위한 핵 내로의 이동을 알아보고자 하였다. 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서 모두 NFATc1은 RANKL 처리 후 15분, 1시간, 2시간 경과 후 발현이 이루어지지 않다가 48시간대에 발현이 증가하였는데, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐는 대조 생쥐에 비해 27.35 ± 3.29 %로 적게 발현하였다 (그림9A, n=4). 또한 면역 형광 염색 결과 48시간대에서 NFATc1의 핵 내로의 이동이 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐는 대조 생쥐 세포에 비해 현저히 감소하였음을 확인하였다 (그림 9B, n=4). 이는 SERCA2의 발현 감소에 의해 분화 중기 이후에 나타나는 칼슘 신호의 소멸과 더불어 NFATc1의 활성과 발현이 감소함을 의미한다.

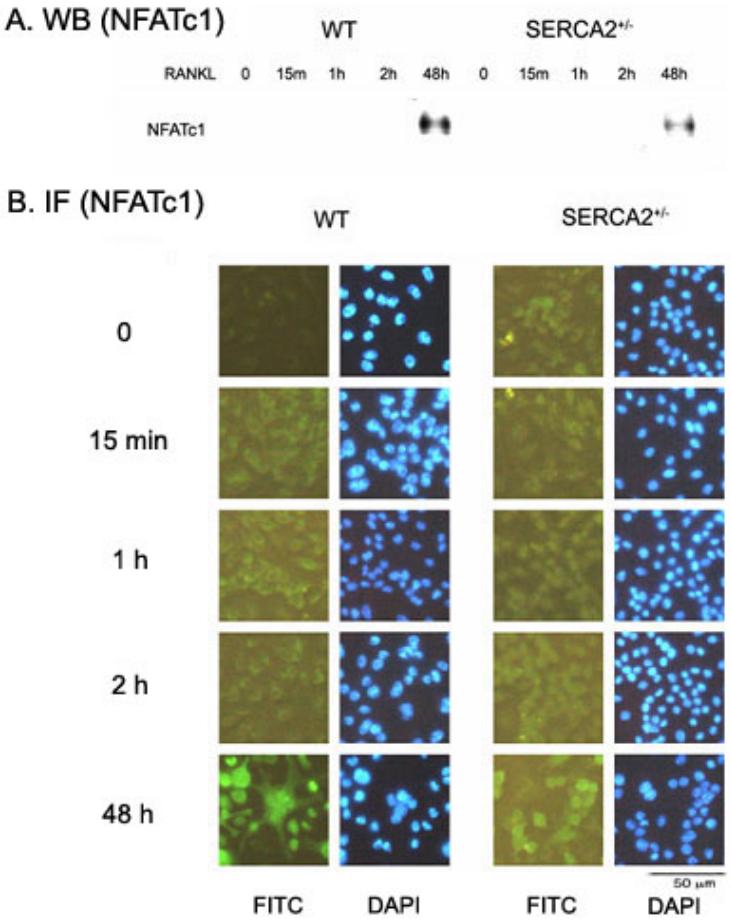

Fig. 9. NFATc1 expression and nuclear translocation stimulated by RANKL. (A) NFATc1 was expressed 48 hrs after RANKL stimulation in both SERCA2$^{+/-}$ and wild-type mice. The expression level decreased in SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type. (B) Immunostaining of NFATc1 in BMMs from wild-type mice shows translocation of NFATc1 into the nucleus 48hrs after RANKL stimulation. However, SERCA2$^{+/-}$ mice show a marked decrease in nuclear translocation. The immuno-blotting and immuno-labeling were the representative of 4 independent experiments.

6. SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포로부터 분화된 다핵세포의 형성량과 골흡수 능력

SERCA2 발현 저하가 파골세포 형성 과정에 직접적으로 관여했는지를 확인하기 위하여 대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포로부터 분화된 파골세포를 TRAP 염색을 이용하여 형성된 파골세포의 개수와 모양을 확인하였다. RANKL 처치 6일 후 TRAP 염색 결과, 양 세포에서 분화된 파골세포의 개수는 거의 차이가 없었다. 그러나 대조 생쥐의 파골세포 전구세포는 대체적으로 거대 다핵세포로의 분화가 정상적으로 이루어진 반면, SERCA2$^{+/-}$ 생쥐로부터 분화된 파골세포는 크기가 작은 단핵세포를 형성하였다 (그림 10A, n=4).

그림 10의 결과를 토대로 다핵세포에서 나타나는 ruffled border의 표지 인자인 actin ring을 형광 염색하여 확인해 보았다. 이 결과, 6일이 지난 후 완전히 성숙된 정상 세포의 파골세포 전구세포로부터 분화된 파골세포의 경우 정상적으로 형성된 ruffled border를 확인할 수 있었으나, SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포로부터 분화된 파골세포에서는 ruffled border가 거의 발견되지 않았다 (그림 10B, n=4).

대조 생쥐와 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 파골세포 전구세포를 RANKL 처리한 후 파골세포로서 정상적인 기능을 하는지를 확인하기 위하여, 양 세포에서 발현된 파골세포의 골흡수 능력을 pit assay를 통하여 확인하였다. 양 세포의 파골세포 전구세포를 OAAS에 RANKL을 처리하지 않은 경우 모두 pit가 형성되지 않았으며, RANKL처리 15일 후 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 pit 면적이 대조 생쥐의 pit 면적에 비하여 68.02 ± 0.78% 감소하였다 (그림 11A와 B, n=4, $P<0.05$).

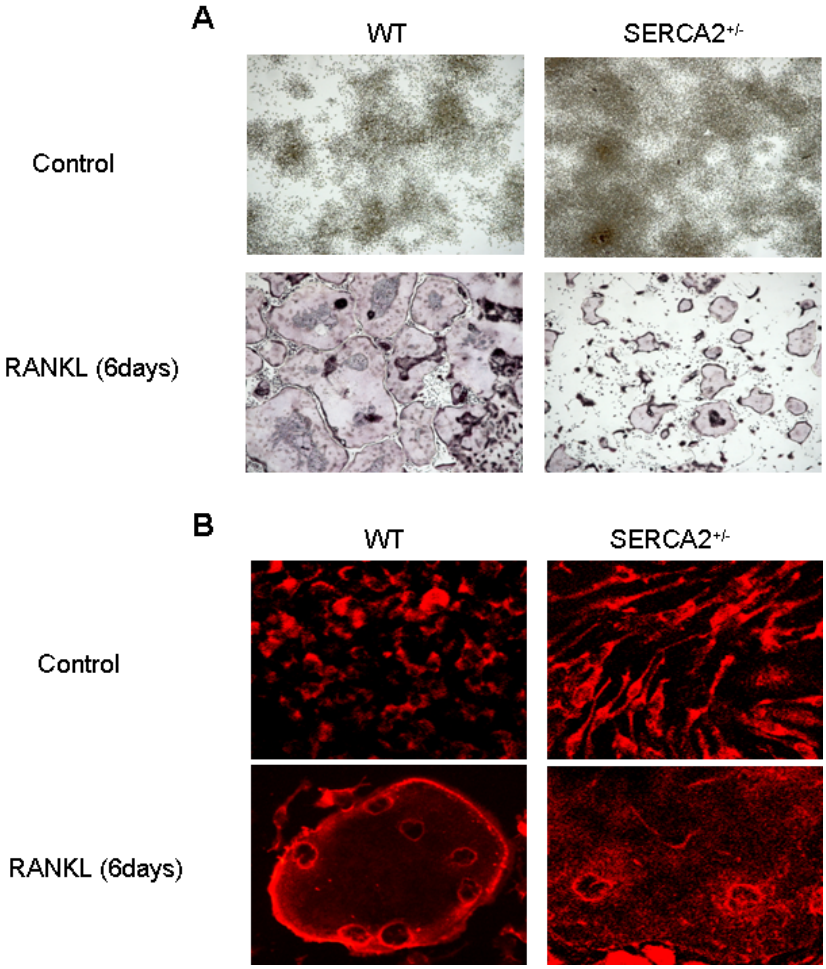

Fig. 10. Differentiation into multinucleated osteoclasts by RANKL stimulation. (A) TRAP staining was performed 6 days after RANKL stimulation. BMMs from wild-type mice differentiated into large multinucleated TRAP-positive cells, whereas BMMs from SERCA2$^{+/-}$ mice remained small and mononuclear. (B) Actin ring formation, which is a marker of mature osteoclasts was only observed in wild-type mice. Images were the representative of 4 independent experiments.

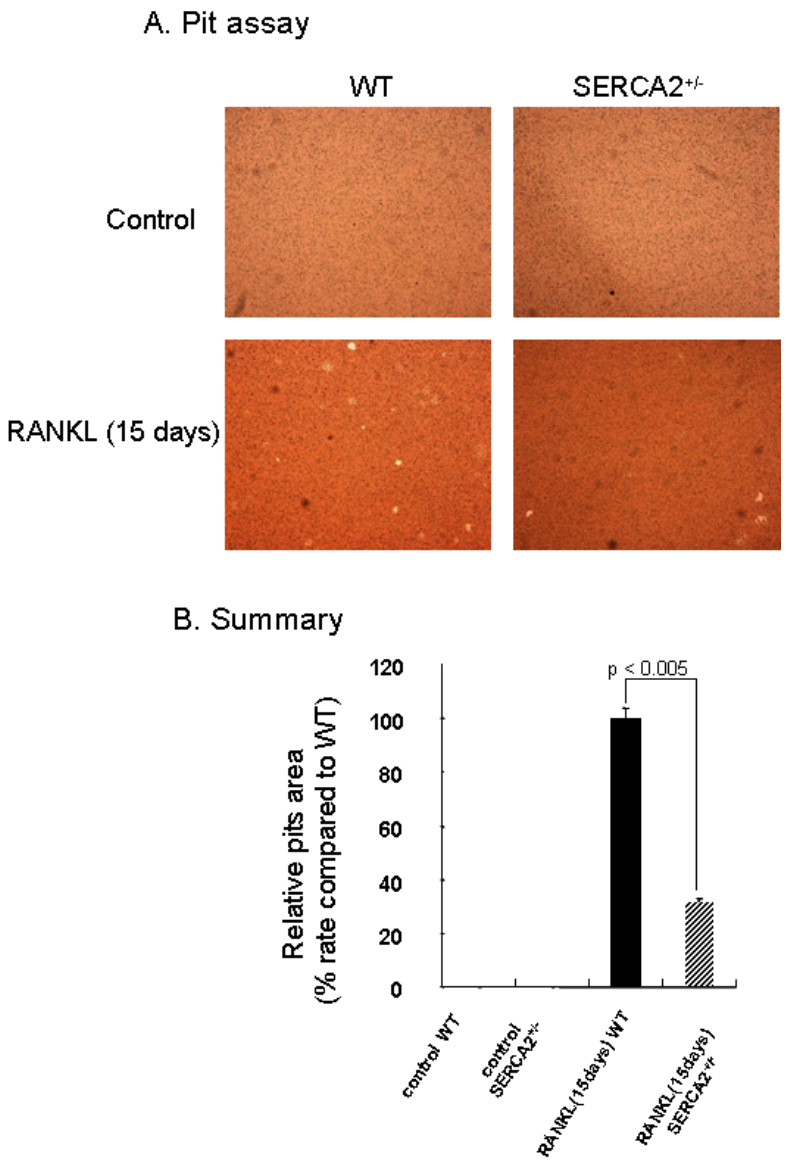

Fig. 11. Bone resorbing activity of osteoclasts. (A) Pit Assay was performed 15 days after RANKL stimulation. Pit formation decreased in BMMs from SERCA2$^{+/-}$ mice. (B) Comparison of relative pit area. Pit assay was a representative of 4 independent experiments (P<0.005).

IV. 고 찰

본 연구에서는 칼슘 신호 관련 인자인 SERCA2 발현이 감소된 생쥐 모델을 이용하여 칼슘 신호의 변동과 골형성의 차이를 추적함으로써, in-vivo 그리고 in-vitro 상에서의 파골세포 분화에서 칼슘 신호의 중요성을 증명하고자 하였다. 세포내의 칼슘 항상성 유지를 위한 칼슘 제거 기전 단백 중의 하나인 SERCA 펌프에 관한 연구는 SERCA 유전자 아형들이 각 각 제거된 생쥐 모델을 이용하여 이루어져왔다. 특히, SERCA2 유전자는 다른 아형들과 다르게 거의 모든 조직의 세포에서 발견되는 "house keeping gene"의 역할을 수행하며, 그 중요성 또한 다른 아형들에 비하여 강조되어 왔다 (Verboomen 등, 1992). 특히, SERCA2 유전자가 완벽히 제거된 생쥐 ($SERCA2^{-/-}$)의 경우 배아 상태에서 죽어버리기 때문에 생산이 불가능하였으며 (Sakuntabhai 등, 1999), 이러한 이유로 SERCA2 이형접합자 생쥐 모델 ($SERCA2^{+/-}$)에서도 외형적 이상이나 병적인 증상이 예상되었는데, Dr. Shull에 의해 제작된 SERCA2 이형접합자 생쥐 모델 ($SERCA2^{+/-}$)의 심근 세포에서는 칼슘 신호 전달계의 변동과 심근 비후가 보고 된 바 있다 (Ji 등, 2000). 한편, Darier Disease에 대한 연구 모델로서 $SERCA2^{+/-}$ 생쥐 췌장선 세포에서의 칼슘 신호 전달의 변동과 더불어 적응성이 관찰되어, SERCA2 유전자인 *ATP2A2* 유전자 변이가 원인인 Darier Disease 환자에서 심각한 장애나 질환을 보이지 않는 이유를 설명할 수 있었다 (Zhao 등, 2001). 또한 SERCA2 결여에 의한 몇 몇 조직에서 칼슘 신호전달계의 변동으로 인하여 생후 약 50주 가량이 지난 $SERCA2^{+/-}$ 생쥐의 생식기를 포함한 몇 몇 조직에서 암종의 발견이 보고 된 바 있다 (Liu 등, 2001). 그러나, 현재까지 SERCA2의 유전자 감소에 의해서 생쥐 개체의 형성 이상, 또는 특이적인 질병 유발의 원인이 된다고 증명된 바 없으며, 골과 연계된 검사는 현재까지 이루어지지 않은 상태이다.

최근 골형성 및 골개조를 위한 조골세포와 파골세포의 분화 시 칼슘 신호전달이 유발된다고 보고되었다 (Takayanaki 등, 2002). 따라서 SERCA2 발현감소 생쥐에서 칼슘 신호 전달계의 변동이 조골세포와 파골세포에서도 나타나 SERCA2 발현

감소 생쥐의 골형성 및 골개조에 영향을 줄 가능성이 있다. 먼저 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골 형태를 관찰해 보았는데 대조군과 비교하여 커다란 이상이 없었다 (그림 4A). 그러나, SERCA2$^{+/-}$와 대조군의 대퇴골 내부를 미세 단층 촬영하여 비교한 결과, 대조군에 비하여 골밀도가 약 50 % 증가되었음을 확인하였다 (그림 4B와 그림 5). 또한 Toluidine blue 시약을 이용하여 뼈 내부를 염색해본 결과도 미세 단층 촬영과 동일하게 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐에서 뼈 내부의 밀도가 증가됨을 확인하였다 (그림 4C). 이는 골형성은 정상적으로 이루어졌으나 골개조 과정에 이상이 생김으로써 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골에서의 골흡수가 감소된 것으로 추측할 수 있다. 세부적으로 살펴보면 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 1) 조골세포의 분화 및 활성의 변동과, 2) 파골세포의 분화 및 활성의 변동이 골밀도 증가의 원인이 되었으리라 가정 할 수 있다. 그런데 rheumatoid arthritis와 같은 질병 연구에서 보고된 바와 같이 in vivo 내 골밀도의 변화는 주로 파골세포의 이상에 주요 원인이 있다고 알려져 있다 (Rodan과 Martin, 2000; Takayanagi 등, 2000). 따라서 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 대퇴골 골밀도의 증가는 주로 파골세포의 분화 및 활성의 변동에 의한 것으로 가정할 수 있다. 특히, 파골세포에서도 SERCA2는 칼슘 신호전달과 밀접한 관련을 갖는 단백이며, 최근 파골세포 분화 중기 이후에 칼슘 신호가 NFATc1의 활성에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Takayanaki 등, 2002). 따라서 본 연구에서는 SERCA2 결여에 의한 칼슘 신호전달계의 변동을 파골세포에서 추적해 보았다.

SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포에서 소포체내의 칼슘의 양이 대조군에 비해 감소하였으며, 이로 인해 효현제 자극 시 전구세포내 칼슘 증가량이 감소하였으나 소포체내의 칼슘 고갈로 인한 외부로부터의 칼슘 유입량에는 변동이 없었다 (그림 6). RANKL 유도성 칼슘 oscillations는 파골세포 전구세포의 분화 단계 중 24시간에서 72 시간대에 나타나는데, RANKL 유도성 칼슘 oscillations은 RANKL에 의해 직접적으로 유도되는 것이 아니라, RANKL/RANK 결합 후 특정한 인자의 발현에 의한 것으로 여겨지고 있다. 본 실험에서 SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포에서는 RANKL 유도성 칼슘 신호가 대조군과는 달리 나타나지 않았다 (그림 7). 또한 SERCA와 더불어 세포질 내 칼슘 제거 기전 중에 하나인 PMCA의 양적인 변동

을 측정해 보았으나, PMCA의 발현 양에는 변동이 없었다 (그림 8). 따라서 SERCA의 인위적인 감소의 영향에 의해 소포체내의 칼슘의 양, 외부 자극 시 칼슘 증가량이 감소되었으며, 이러한 변동이 원인이 되어 RANKL 유도성 칼슘 oscillations가 사라졌다고 판단된다. 그런데 SERCA2$^{+/-}$ 생쥐의 심근과 췌장선 세포에서 SERCA2의 감소로 인해 일종의 적응효과로 생긴 PMCA의 발현의 증가 (Liu 등, 2001)는 SERCA2$^{+/-}$ 파골세포에서는 보이지 않았다 (그림 8). 이는 PMCA의 발현 증가로 SERCA의 기능저하가 어느 정도 상쇄되었던 심근이나 췌장선 세포에서 기능 및 형태상의 이상이 보이지 않은 반면 (Liu 등, 2001; Zhao 등, 2001), 대퇴골에서는 SERCA의 발현 저하에 따른 기능을 상쇄 시켜줄 수 있는 PMCA의 발현에 변동이 없었기 때문에 결과적으로 골밀도가 증가되는 형태상의 변화가 생겼으리라 추측된다.

NFATc1 은 TRAF6, c-Fos 그리고 칼슘 oscillations에 의해서 활성화될 수 있다. 칼슘 oscillations는 calcineurin을 활성화 시켜 NFATc1의 자가 증식 (autoamplification)을 유도하며, 이를 탈인산화시켜 세포막에서 핵 내로의 이동을 촉진시킨다. 핵 내로 이동한 NFATc1은 파골세포 분화에 필요한 여러 인자들의 전사 인자로서 중요한 역할을 하며, RANKL/RANK 결합 이후 약 24시간 이후에 발현 및 핵 내로 이동되는 특징을 갖고 있다 (Takayanaki 등, 2002, 2005). 양 세포에서 RANKL 처리 15분, 1시간 그리고 2시간 이후 NFATc1이 거의 발현되지 않았으며, SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포에서 RANKL 처리 48시간 이후에 발현 및 핵 내로 이동되는 NFATc1이 대조군에 비하여 감소됨을 확인하였다 (그림 9). 이상의 결과는, SERCA2의 발현 저하가 칼슘 신호전달계에 영향을 주었으며 이로 인해 NFATc1의 활성이 감소됨을 의미하며, 칼슘 oscillations가 NFATc1의 활성 유도에 커다란 역할을 하고 있음을 의미한다.

NFATc1 은 파골세포 분화를 위하여 가장 중요한 인자 중의 하나이기 때문에 칼슘 신호 변동에 의한 NFATc1의 감소가 파골세포 분화에 영향을 주었을 가능성이 있다. 이를 알아보기 위하여 TRAP 염색과 actin rings의 형성을 확인하였다. TRAP은 cathepsin K, calcitonin receptor 그리고 β_3-integrin과 함께 성숙한 파골세포의 표지 인자로서 파골세포가 단핵세포에서 성숙한 다핵세포로 분화하면 발

현된다 (Lacey 등, 1998). 따라서 TRAP 양성 세포의 경우 성숙한 파골세포로 분화되었음을 의미한다. 또한 파골세포는 골흡수를 위하여 골표면과 강력한 봉인 (tight seal)을 형성한다. 이때 형성된 봉인은 actin filaments로 구성되어 있으며, actin rings를 확인함으로써 골흡수를 위해 골조직에 흡착되어있는 파골세포의 확인이 가능하다 (Wang 등, 2003). SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포로부터 분화한 파골세포는 TRAP 염색 결과 수적인 측면에서 대조군과 비슷한 수준의 파골세포로 분화되었다. 하지만 파골세포의 크기가 대조군에 비해 매우 작은 특징을 보였다 (그림 10A). 또한 actin rings를 확인한 결과, SERCA2$^{+/-}$ 파골세포는 대조군에 비해 크기가 작은 봉인을 형성하는 파골세포로 분화되었다 (그림 10B). 양 세포 모두에서 다핵세포인 파골세포로의 분화가 확인되었으며, 골조직과 세포사이의 봉인도 대체적으로 정상적으로 이루어졌음이 확인되었다. 다만, SERCA2$^{+/-}$ 파골세포는 크기가 대체적으로 작고 봉인 또한 대조군에 비하여 뚜렷하지 않은 특징이 있었다. 이러한 파골세포의 형성의 차이는 파골세포의 활성에 영향을 주었을 가능성이 있다. 마지막으로 양 세포에서의 파골세포 활성도의 차이를 확인하기 위하여 양 세포를 dentin slice 상에서 배양하여 6일 후 dentin slice에 형성되는 구멍 (pits)을 확인한 결과 SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포로 배양된 dentin slice에서 구멍의 형성이 현저히 감소됨을 확인하였다 (그림 11).

소포체내의 칼슘의 재충전 (refilling)은 파골세포 분화에 필수적임이 보고된 바 있으며 (Mentaverri 등, 2003), 소포체내 칼슘을 재충전 하는 SERCA의 감소가 파골세포의 분화와 활성에 영향을 준다는 측면에서 본 연구는 이전의 보고와 일치된 결과를 보였다. 본 연구는 RANKL 유도성 파골세포분화의 중요 인자로 알려진 TRAF6와 c-Fos 이외에 칼슘 oscillations가 중요한 인자로 작용할 수 있음을 in-vivo와 in-vitro상에서 증명하였으며, 칼슘 신호의 발생에 SERCA의 역할이 중요함을 확인하였다. 또한, 본 연구에서 배제하였던 조골세포 분화에 SERCA2의 감소가 영향을 주었을 가능성이 있으나, 뼈의 크기 및 형태가 대조군과 유사한 것으로 보아 조골세포에서의 칼슘 신호전달계에는 일종의 적응현상이 생겼으리라 추측되며, 이후의 연구에서는 SERCA2$^{+/-}$ 조골세포에서의 칼슘 신호전달계의 변동과 발현 및 활성의 관계에 대한 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

SERCA2$^{+/-}$와 대조 생쥐의 파골세포 전구세포에서 칼슘신호 단백의 발현과 RANKL 처리 후 측정된 칼슘신호와 신호전달 단백의 발현 양을 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 미세 컴퓨터 단층촬영과 골 염색법을 통해 SERCA2$^{+/-}$에서는 대조 생쥐에 비해 약 50% 정도 골밀도가 증가하였음을 확인하였다.

2. SERCA2$^{+/-}$ 파골세포 전구세포에서 SERCA를 억제하여 측정된 소포체내 칼슘의 양은 대조군에 비해 적었다.

3. 파골세포 분화제인 RANKL 처치 시 대조 전구세포에서는 약 24시간에서 72시간까지 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화 ($[Ca^{2+}]_i$ oscillations)가 관측되었으나, SERCA2$^{+/-}$에서는 칼슘신호가 관찰되지 않았다.

4. 대조군에 비해 SERCA2$^{+/-}$에서는 SERCA의 발현이 감소하였으며, plasma membrane Ca^{2+} ATPase의 발현은 동일하였다.

5. RANKL 처리 후 48시간에서 칼슘신호에 의해 활성화되는 NFATc1의 발현 양과 NFATc1의 핵 내로의 이동이 SERCA2$^{+/-}$에서 감소하였다.

6. RANKL 처리 후 6일 후에 SERCA2$^{+/-}$에서는 다핵세포로의 분화가 현저히 감소하였으며, 다핵세포 형성 인식표지인 actin ring의 형성이 거의 발생하지 않았다.

7. SERCA2$^{+/-}$에서는 골흡수 능력이 약 70% 정도 감소하였다.

이상의 결과는 기존에 알려진 RANKL 신호전달 경로에서 칼슘신호의 활성화가 파골세포 분화과정에 필수적인 신호임을 의미하며, 파골세포 전구세포에서의 칼슘 신호, 칼슘 oscillations의 발생은 SERCA의 활성에 의해서 조절되어질 수 있다. 따라서 SERCA의 활성은 파골세포의 분화, 형성 그리고 활성을 위하여 필수적인 요소임을 발견하였다.

참 고 문 헌

Ash P, Loutit JF, and Townsend KM: Osteoclasts derived from hematopoietic stem cells. *Nature* 283: 669-70, 1980.

Berridge MJ, Martin D, Bootman H, and Roderick L: Calcium Signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 517-529, 2003.

Boyle WJ, Simonet WS, and Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-42, 2003.

Gunteski-Hamblin AM, Greeb J, and Shull GE: A novel Ca^{2+} pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca^{2+} and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem* 263:15032-15040, 1988.

Helfrich MH: Osteoclast diseases. *Microsc Res Tech* 61: 514-32, 2003.

Hong JH, Lee SI, Kim KE, Yong TS, Seo JT, Sohn MH, and Shin DM: German cockroach extract activates protease-activated receptor 2 in human airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 113: 315-319, 2004.

Ji Y, Lalli MJ, Babu GJ, Xu YF, Kirkpatrick DL, Liu LH, Chiamvimonva N,

Walsh RA, Shull GE, and Periasamy M: Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca^{2+} homeostasis and cardiomyocyte function. *J Biol Chem* 275: 38073-38080, 2000.

Katagiri T, and Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* 8: 147-159, 2002.

Khosla S: Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5, 2001.

Kiselyov K, Shin DM, and Muallem S: Signalling specificity in GPCR-dependent Ca^{2+} signaling. *Cellular Signaling* 15: 243-253, 2003.

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, and Takayanagi H: Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428: 758-63, 2004.

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, and Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176, 1998.

Liu LH, Boivin GP, Prasad V, Periasamy M, and Shull GE: Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *ATP2A2,* encoding the

sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoform 2 Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 276: 26737 - 26740, 2001.

Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137, 2000.

Mentaverri R, Kamel S, and Brazier M: Involvement of capacitive calcium entry and calcium store refilling in osteoclastic survival and bone resorption process. *Cell Calcium* 34: 169-175, 2003.

Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, and Shull, GE: Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase isoform 2 (SERCA2) Gene. *J Biol Chem* 274: 2556-2562, 1999.

Reitan K: Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 46: 881 - 900, 1960.

Reitan K: Effect of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone type. *Angle Orthod* 34: 244 - 255, 1964.

Roberts WE, Goodwin WC, and Heiner SR: Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin North Am* 25:3, 1981.

Roberts WE: Bone physiology, metabolism, and biomechanics in orthodontic practice. In Orthodontics: current principles and techniques. Graber TM, Varnasdall RL, editors, 2000, Mosby, St Louis.

Rodan GA and Martin TJ: Therapeutic approaches to bone diseases: *Science* 289(5484):1508-14, 2000.

Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, and Carter S: Mutations in *ATP2A2*, encoding a Ca^{2+} pump, cause Darier disease. *Nat Genet* 21: 271-277, 1999.

Shin DM, Dehoff M, Luo X, Kang SH, Tu J, Nayak SK, Ross EM, Worley P F, and Muallem S: Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and PLCβ GAP activities. *J Cell Biol* 162: 293-303, 2003.

Smith RK and Roberts WE: Cell kinetics of the initial response to orthodontically induced osteogenesis in rat molar periodontal ligament. *Calcif Tissue Int* 30: 51, 1980.

Storey E: The nature of tooth movement. *Am J Orthod* 63: 292 - 314, 1973.

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, and Taniguchi T: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408: 600-5, 2000.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A,

Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, and Tanigichi T: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell* 3: 889-901, 2002.

Takayanagi H: Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83: 170-179, 2005.

Tran Van PT, Vignery A, and Baron R: Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anat Rec* 202: 445-51, 1982.

Verboomen H, Wuytack F, De Smedt HB, Himpens R, and Casteels R: Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca^{2+} pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* 286: 591-596, 1992.

Verboomen H, Wuytack F, Van den Bosch L, Mertens L, and Casteels R: The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca^{2+}-transport ATPase (SERCA2 a/b). *Biochem J* 303: 979-984, 1994.

Wang Q, Y Xie, QS Du, XJ Wu, X Feng, L Mei, JM McDonald, and WC Xion: Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin. *J Cell Biol* 160: 565 - 575, 2003.

Wuytack F and Raeymaekers L: The Ca^{2+}-transport ATPases from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* 24: 285-300, 1992.

Zhao XS, Shin DM, Liu LH, Shull GE, and Muallem S: Plasticity and adaptation of Ca^{2+} signaling and Ca^{2+}-dependent exocytosis in SERCA2$^{+/-}$ mice. *EMBO J* 20: 2680-2689, 2001.

Abstract

Effect of a partial loss of SERCA2 on osteoclast differentiation

Ji Hyun Lee, D.D.S., M.S.D.

Department of Dental Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Kyung-Ho Kim**, D.D.S., Ph.D.)

Differentiated osteoclats resorb bone, which results in increase of blood Ca^{2+} level and bone remodeling. Receptor activator of NF-kB ligand (RANKL) is expressed on osteoblasts and induces the signaling essential for precursor cells to differentiate into osteoclasts. Binding of RANKL to RANK results in the recruitment of TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) which activates the NFκB, c-Fos, JNK and ERK pathways. Recent studies have shown that, Ca^{2+} signaling is evoked in osteoclast precursor cells in the terminal stage of osteoclastogenesis. Ca^{2+} signals usually occur in the form of Ca^{2+} oscillations, which is a repeated and periodic transient change of intracellular Ca^{2+} level. However, the precise role of Ca^{2+} signaling in the process of osteoclatogenesis, is as yet unknown. Sarco/endoplasmic recticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) is a Ca^{2+} signaling-related protein which serves to maintain low intracellular Ca^{2+} level. In a preliminary study, SERCA2 heterozygotic mice ($SERCA2^{+/-}$) which were produced by deletion of one copy of the *ATP2A2* gene, showed increased bone density compared to wild-type mice. Therefore we started a research to

elucidate the effect of decreased SERCA expression in the differentiation of osteoclasts, in a cell physiological and biochemical manner.

Fluorescence level of Fura2 in bone marrow derived monocyte/macrophage precursor cells was measured in order to compare intracellular Ca^{2+} level of cells from SERCA2$^{+/-}$ and wild-type mice. Immuno-blotting and immuno-labeling were used in order to compare expression levels and activation rate of proteins related to osteoclastogenesis. Osteoclast activity was checked by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and pit assay.

SERCA2$^{+/-}$ mice showed a 50% increase in bone density according to two dimensional micro CT images and tolouidine blue staining. Endoplasmic Ca^{2+} store and amount of Ca^{2+} release triggered by ATP stimulation was decreased in SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type mice. However, the amount of Ca^{2+} influx, after emptying of the endoplasmic Ca^{2+} store showed no difference.

In wild-type osteoclast precursor cells, Ca^{2+} oscillations were observed 24 to 72hrs after RANKL stimulation. However, Ca^{2+} oscillations were not observed in SERCA2$^{+/-}$ osteoclast precursor cells. The expression level of SERCA2 was decreased in SERCA2$^{+/-}$ osteoclast precursor cells compared to wild-type osteoclast precursor cells. However, no difference was found in the expression level of plasma membrane Ca^{2+} ATPase. The expression level of nuclear factor of activated T cell (NFATc1) and nuclear translocation after 48hrs of RANKL stimulation was decreased in SERCA2$^{+/-}$ osteoclast precursor cells compared to wild-type osteoclast precursor cells. Differentiation of mononuclear cells into multinucleated cells, 6 days after RANKL treatment, was markedly suppressed in SERCA2$^{+/-}$ mice compared to wild-type. Furthermore, actin rings, which are known as markers of multinucleated osteoclast, were not detectable in SERCA2$^{+/-}$ osteoclasts. Hence, the activity of SERCA2$^{+/-}$ osteoclasts in absorbing bone was decreased in SERCA2$^{+/-}$ osteoclasts.

According to these results we may suggest that Ca^{2+} signaling is essential

for RANKL-induced osteoclastogenesis. Further studies are necessary for the understanding of the precise molecular mechanism during osteoclast differentiation.

Key Words : Osteoclast, RANKL, SERCA2, SERCA2 heterozygote mice, Ca^{2+} signaling