

Macrophage Colony-Stimulating Factor와 Osteoclast Differentiation Factor로 분화 유도된 생쥐 파골세포에서 Vitamin D 및 수종의 싸이토카인 수용체의 발현

성수미¹ · 엄홍식¹ · 고성희² · 우경미³ · 장범석¹

¹강릉대학교 치과대학 치주과학교실,

²강릉대학교 치과대학 치과약리학교실,

³강릉대학교 치과대학 구강해부학교실

I. 서론

치주질환은 30대 이후 성인에서 치아상실의 가장 중요한 원인이 되는 질병이다. 치태내 세균에 의해 유발된 만성염증의 결과로 치아 지지조직의 파괴가 일어나는데, 특히 치조골의 파괴는 치아상실의 결정적인 원인이다. 치주질환에서 치조골의 파괴는 골괴사 과정이 아닌 살아있는 세포들의 활동성에 의한 것으로서, 조골세포에 의한 골형성 및 파골세포에 의한 골흡수의 균형이 파괴됨으로써 일어나는데, 파골세포의 활동적인 골흡수가 보다 큰 기여를 하는 것으로 알려져 있다^{1,2}. 따라서 골조직의 파괴를 일차적으로 담당하는 파골세포의 분화 및 활성화와 그 기전에 관한 이해는 치조골 파괴진행의 차단과 파괴된 치조골의 수복 등에 있어 필수적이다.

파골세포는 조혈간세포 (hematopoietic stem cells)에서 유래한 다핵거대세포로서, 그 분화 및 활성화는 전신적인 호르몬이나 국소적 조절인자와 같은 수용성 물질이 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히, 그 분화에 조골세포/골수기질세포가 필수적인

것으로 보고되었다. 또한 최근 이러한 영향이 조골세포의 세포표면단백질인 osteoclast differentiation factor(ODF/RANKL/OPDL)에 의한 것이 보고되었으며, 여러 호르몬과 싸이토카인이 ODF나 그 decoy receptor인 osteoprotegerin(OPG/OCIF)의 발현을 조절하여 파골세포의 분화에 영향을 미친 것으로 생각된다³.

그러나 Vitamin D와 여러 싸이토카인이 조골세포와 골수기질세포를 통한 ODF 매개에 의하지 않고 직접 파골세포에 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없다. 파골세포 분화에 관한 연구는 주로 생체실험 및 조골세포와 파골세포 전구세포를 포함하는 골수조직세포, 비장세포 및 말초혈액세포와의 혼합배양 시스템을 통해 규명되어 왔으나⁴, 여러 가지 조절인자들의 직접적인 영향을 알아보고 그 분자수준의 기전을 이해하려면 순수 파골세포를 분리하여 연구하여야 한다. 파골세포는 그 수가 적고 석회화된 기질에 매식되어 있으며 분리 후 파괴가 잘 되기 때문에 순수분리에 어려움이 많아⁵, 이러한 연구가 현재까지 중요한 과제로 남아 있다.

최근 파골세포 전구세포가 조골세포나 기질세포의 지지없이 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 sODF의 투여로 파골세포로 분화됨이 보고되었다⁶⁻⁸⁾. 이에따라 파골세포 연구에 있어 새로운 전기가 마련되었다. 파골세포 전구세포를 분리하고 M-CSF와 sODF를 처리하여 파골세포를 형성시킴으로써 파골세포에서의 세포 및 분자 수준의 연구가 가능하게 됨으로써 파골세포 전구세포의 분리에 관한 연구가 활발히 보고되고 있다. 생쥐 골수세포와 조골세포를 혼합배양하거나 M-CSF 등의 사이토카인을 투여하여 파골세포 전구세포를 시험관내에서 형성시켜 분리하거나⁹⁻¹²⁾, 생쥐 장골조직에서 형성된 파골세포 전구세포를 분리하였다¹³⁾. 본 연구에서는 파골세포의 분화 및 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려진 Vitamin D 및 사이토카인이 파골세포 및 그 전구세포에 직접적인 영향을 미칠 수 있는지 알아보기 위하여, 생쥐 장골조직에서 파골세포 전구세포를 순수분리하고 성숙한 세포로 분화를 유도한 후 이들 세포에서 파골세포의 분화 및 활성화에 영향을 미치는 수중호르몬 및 사이토카인 수용체가 발현되는지 조사하였다.

II. 실험방법 및 재료

1. 생쥐 파골세포 전구세포의 분리, 배양 및 분화 유도

생후 4-6주된 생쥐(ICR)에서 상완골, 척골, 경골 및 대퇴골을 무균적으로 적출하여 penicillin-streptomycin(GibcoBRL, U.S.A.)을 포함한 Hank 용액(GibcoBRL)에서 2회 수세하고 연조직을 제거하고 골간부를 분리하였다. 22 gauge 주사침을 이용하여 골간부에서 골수세포를 제거하고 1 mg/ml type II collagenase(GibcoBRL), 0.05% trypsin (GibcoBRL), 4mM EDTA(Sigma, U.S.A.)를 Hank 용액에 용해시킨 효소용액에 넣고 37°C, 5% CO₂, 95% 습도를 유지하는 배양기에서 15분 간격으로 5회 순차적으로 소화시켜 세포 현탁액을 버린 후, 뼈조각을 α -MEM(GibcoBRL)에 넣고 4°C에서 15분간 방치후 1분간 기계적으로 진탕하여 뼈조각에서 분리된 전구파골세포를 함유한 세포현탁액을 얻고, 이를 cell strainer(40 μ m Nylon, Falcon, U.S.A.)에 여과시켜 분리하였다. 분리한 파골세포전구세포를 100-mm 배양접시(Nunc, U.S.A.)에 1 x 10⁷개의 세포를 식립하고, 20 ng/ml recombinant human M-CSF(R&D systems, U.S.A.), 30 ng/ml recombinant human soluble osteoclast differentiation factor(sODF, soluble RANK Ligand/sRANKL, PeprotechEC, England) 및 10%

Table 1. RT-PCR primers and conditions for the specific amplification of mouse mRNA

target gene	sequences of primers	annealing temp. (°C)	Ref.
VDR	F 5' -TTTGGTTGGACAGATCTGTG-3' R 5' -ATGGCACTTGACTTAAGCAG-3'	55	
TNF α R	F 5' -CAGAAAAGACACCATGAGCA-3' R 5' -AAGTACTTGGGCAGATTGAC-3'	55	
IL-1RI	F 5' -CTAGAAGTGAGCTGTCTGTGTC-3' R 5' -GAACTCTGATGACATCCAGCG-3'	60	20
IL-1RII	F 5' -TTACATCGGAGAAGCCCACAG-3' R 5' -TCAATAGGCGTGTGGGGTC-3'	60	20
IL-6R	F 5' -CCTGTGTGGGGTTCCAGAGGAT-3' R 5' -CTGCCAGGTGGAGATCCTGGAG-3'	60	19
TGF β RI	F 5' -GGCTGCTTTCAGGTTTATGA-3' R 5' -AACCATGACTTCTCGTCTCG-3'	55	
β -actin	F 5' -ATGTGCAAGGCCGGCTTCGCGGGC-3' R 5' -GATGTCCACGTACACTTCATGAT-3'	60	

fetal calf serum(GibcoBRL)이 함유된 α MEM에서 2 또는 7일간 세포배양하여 분화를 유도하였다(Figure 1, 2, 3, 4).

2. RT-PCR

순수 분리한 파골세포전구세포를 2일간 또는 7일간 배양 후 RNeasy kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 각 배양군의 total RNA 1 μ g을 SuperScriptII(GibcoBRL) 역전사효소를 사용하여 42°C에서 30분간 역전사시켜 20 μ l의 cDNA 용액을 얻었다. cDNA 1 μ l에서 PCR 증폭을 시행하여 각 호르몬 및 싸이토카인 수용체의 전사체가 발현되는지 조사하였다. PCR 증폭은 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C 또는 62°C에서 30초간 annealing 및 72°C에서 1분간 extension 과정을 30-40회 반복하였다. 이 때 사용한 primer 염기서열은 Table 1과 같다. 이 때 각 시료의 사용한 RNA양의 대조군으로 β -actin을 사용하였다(Figure 5).

III. 실험결과

본 연구에서는 ICR생쥐 장골조직에서 순수분리한 파골세포 전구세포 (TRAP 양성 단핵세포)에 M-CSF와 sODF를 투여하여 2일간 및 7일간 배양한 세포에서 전사체의 발현을 RT-PCR 기법으로 조사하였다. 그 결과 Vitamin D 수용체는 2일간 배양한 세포에서 발현되지 않았으며, 7일간 배양한 세포에서는 발현된 전사체가 검출되었다(Figure 6). TNF- α 수용체는 2일간 배양한 세포에서도 약하게 발현되었으며, 7일간 배양한 세포에서는 그 발현이 증가되었다(Figure 7). 제1형 IL-1 수용체는 2일간 및 7일간 배양한 세포 모두에서 발현되지 않았으나(Figure 8), 제2형 IL-1 수용체는 2일간 배양한 세포에서 발현되었다(Figure 9). IL-6 수용체는 7일간 배양한 세포에서 발현되었다(Figure 10). 제1형 TGF- β 수용체는 2일간 및 7일간 배양한 세포에서 모두 발현되었으나 7일간 배양한 세포에서 발현이 증가됨을 관찰되었다(Figure 11).

IV. 총괄 및 고안

치주질환에서 수반되는 골조직의 손상을 수복하기 위한 여러 가지 치료법이 시도되고 있는데, 최근 싸이토카인 및 성장인자의 작용이 규명되어감에 따라 이들의 재조합 단백질이나 DNA 형태의 유전자 치료법이 새로운 접근법으로 주목받고 있다¹⁴⁻¹⁶. 이러한 수복치료 및 질환의 진행 차단을 위해 각 조절인자의 작용 및 그 기전에 대한 이해가 선결과제라 할 수 있다. 본 연구에서는 Vitamin D 및 싸이토카인의 파골세포에 대한 직접적인 작용을 검색하기 위한 선행 연구로서, 파골세포 전구세포와 성숙된 파골세포에서의 Vitamin D 및 싸이토카인들의 수용체의 발현을 조사하여, 현재 논쟁이 되고 있는 vitamin D 수용체가 발현되고 여러 싸이토카인 수용체가 파골세포 분화 단계에 따라 달리 발현된다는 것을 관찰하였다.

파골세포는 단핵구/대식세포계의 간세포(stem cell)가 증식능을 가지는 파골세포 전구세포로 분화되어 파골세포로의 분화가 결정되며, 이후 단핵파골세포로 분화되며 이 세포들이 융합에 의하여 다핵 거대세포로 최종분화된다^{7, 18, 31}. 본 연구에서 사용한 생쥐(ICR) 파골세포전구세포는 장골에서 분리한 TRAP 양성 단핵세포로서 M-CSF 투여시 증식하며 c-kit(stem cell factor receptor)는 발현되지 않으나, c-fms(M-CSF receptor) 및 RANK(ODF receptor)는 발현되는 세포로서, Arai 등¹⁸의 모델에 적용하면 파골세포로의 분화가 결정된 후기 전구세포 (late stage committed precursor)이다. 이 세포에 M-CSF 및 sODF를 투여하며 배양하면 배양 2일째 vitronectin receptor 및 calcitonin receptor도 발현하며, 배양 7일째에는 골흡수능을 가지는 성숙한 다핵 파골세포로 분화된다³¹. 다른 연구 보고에서의 시험관내에서 형성시킨 파골세포 전구세포보다는 생체내에서의 표현형질을 발현하고 있기 때문에 파골세포의 분화 과정의 연구에 좀더 적합하다 할 수 있다.

본 연구에서 순수분리한 세포를 M-CSF와 sODF를 투여하여 2일간 세포배양하면 TRAP 염색성은 보다 강해지나 단핵세포 상태를 유지하고 있는 파골세포 전구세포의 분화단계가 되며, 7일간 세포배양하면

다수의 성숙한 다핵 파골세포가 형성되는데, 본 연구에서는 이렇게 하여 형성된 성숙한 다핵 파골세포를 사용하였다. Vitamin D 수용체와 IL-6 수용체는 보다 분화가 진행된 7일간 배양한 세포에서 발현되었으며, 제2형 IL-1 수용체는 파골세포전구세포의 단계라 생각되는 2일간 배양한 세포에서만 발현되었다. 이러한 연구결과는 이들 호르몬 및 사이토카인이 파골세포 분화시기중 특정 분화시기에 선택적으로 작용할 수 있음을 시사하는 것으로서, 구체적인 작용시기에 대한 향후의 실험이 요구된다. 또한 본 연구에서 7일간 배양으로 얻어지는 세포들은 다핵거대세포가 다수 포함되어 있으나 단핵세포도 많이 포함되어 있기 때문에 분화단계에 따른 수용체의 발현은 면역염색 실험 등을 통하여 확인되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

순수분리한 생쥐 파골세포 전구세포를 M-CSF 및 sODF를 투여하여 2일간 및 7일간 세포배양하여 분화유도한 파골세포에서 다음과 같은 수용체의 전사체가 발현됨을 관찰하였다.

1. vitamin D 수용체는 2일간 배양한 세포에서 발현되지 않았으며 7일간 배양한 세포에서는 발현된 전사체가 검출되었다.
2. TNF- α 수용체는 2일간 배양한 세포에서도 약하게 발현되었으며, 7일간 배양한 세포에서는 그 발현이 증가되었다.
3. 제1형 IL-1 수용체는 2일간 및 7일간 배양한 세포 모두에서 발현되지 않았다.
4. 제 2형 IL-1 수용체는 wdlfrks 배양한 세포에서 발현되었다.
5. IL-6 수용체는 7일간 배양한 세포에서 발현되었다.
6. 제 1형 TGF- β 수용체는 2일간 및 7일간 배양한 세포에서 모두 발현 되었으나 7일간 배양한 세포에서 발현이 증가되었다.

본 연구결과는 Vitamin D 및 사이토카인들이 파골

세포에 직접적인 작용을 미칠 수 있음을 시사하며, 그 작용은 앞으로의 실험 등을 통하여 확인 되어야 할 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

1. Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, D.D., and Boyan, B.D. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 14:158, 1997.
2. Nair, S.P., Meghji, S., Wilson, M., Reddy, K., White, P., and Henderson, B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 64: 2371, 1996.
3. Roodman, G.D.: Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* 27:1229-1241, 1999.
4. Suda, T., Nakamura, I., Jimi, E., and Takahashi, N. Regulation of osteoclast function. *J. Bone Miner Res* 12; 869-879. 1997.
5. Helfrich, M., Sato, T., Tezuka, K., Kumegawa, M., Nesbitt, S., Horton, M., and Collin-Osdoby, P.: Isolation of osteoclasts and osteoclast plasma membrane. In "Cell Biology, A laboratory handbook, Vol. 1", Ed. by Celis, J.E., pp.128-141, Academic Press, San Diego etc., 1994.
6. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165, 1998.
7. Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., Chambers, T.J.: TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188:997, 1998.

8. Takahashi, N., Udagawa, N., Suda, T.: A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256(3):449, 1999.
9. Weslowski, G., Duong, L.G., Lakkakorpi, P.T., Nagy, R.M., Tezuka, K., Tanaka, H., Rodan, G., and Rodan, S.: Isolation and characterization of highly enriched, perfusion mouse osteoclastic cells. *Exp. Cell Res.*, 219:679-686, 1995.
10. Tsurukai, T., Takahashi, N., Jimi, E., Nakamura, I., Udagawa, N., Nogimori, K., Tamura, M., and Suda, T. Isolation and characterization of osteoclast precursors that differentiate into osteoclasts on calvarial cells within a short period of time. *J. Cell. Physiol.* 177:26-35, 1998.
11. Hentunen, T.A., Reddy, S.V., Boyce, B.F., Devlin, R., Park, H.-R., Chung, H., Selander, K.S., Dallas, M., Kurihara, N., Galson, D.L., Goldring, S.R., Koop, B.A., Windle, J.J., and Roodman, G.D. Immortalization of osteoclast precursors by targeting bcl-XL and simian virus 40 large T antigen to the osteoclast lineage in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 102:88-97, 1998.
12. Takeshita, S., Kaji K., and Kudo, A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 15:1477-1488, 2000.
13. Woo, K.M., Kim, H.-M., and Ko, J.-S. Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors through up-regulating Bcl-XL (submitted).
14. Giannobile WV : Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 19(suppl 1): 23s-37s, 1996.
15. Fang J, Zhu Y-Y, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ : Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteoinductive plasmid genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5753-5758, 1996.
16. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S : Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nature Medicine* 5(7): 753-759, 1999.
17. Hayashi, S.-I., Yamane, T., Miyamoto, A., Hemmi, H., Tagaya, H., Tanio, Y., Kanda, H., Yamazaki, H., Kunisada, T.: Commitment and differentiation of stem cells to osteoclast lineage. *Biochem. Cell. Biol.* 76:911-922, 1998.
18. Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D.M., Suda, T.: Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κ B(RANK) Receptors. *J Exp Med* 190:1741-1754, 1999.
19. Atkins, G.J., Haynes, D.R., Graves, S.E., Evdokiou, A., Hay, S., Bouralexis, S., and Findlay, D.M. Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors. *J. Bone Miner. Res.* 15:640-649, 2000.
20. Haynes, D.R., Atkin, G.J., Loric, M., Crotti, T.N., Geary, S.M., and Findlay, D.M. Bidirectional signaling between stromal and hemopoietic cells regulates interleukin-1 expression during human osteoclast formation. *Bone* 25:269-278, 1999.

사진부도 설명

- Figure 1. 세포배양 2일째. TRAP 양성 세포로 파골세포로 분화하는 단핵세포.
Figure 2. 세포배양 4일째. TRAP 양성 세포로 다핵 세포.
Figure 3. 세포배양 7일째. 파골세포
Figure 4. 세포배양 10일째. 파골세포의 apoptosis가 일어나고 있음
Figure 5. β -actin(대조군)
Figure 6. Vit D 수용체
Figure 7. TNF- α 수용체
Figure 8. 제1형 IL-1 수용체
Figure 9. 제2형 IL-1 수용체
Figure 10. IL-6 수용체
Figure 11. 제1형 TGF- β 수용체

사진부도 (I)



Figure 1

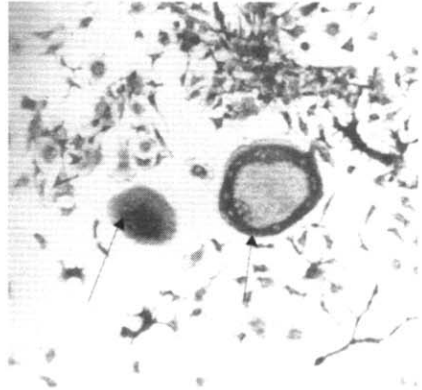


Figure 2



Figure 3

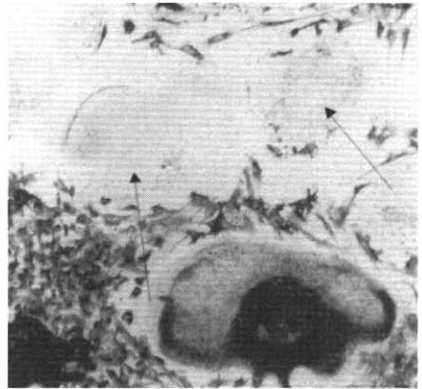


Figure 4

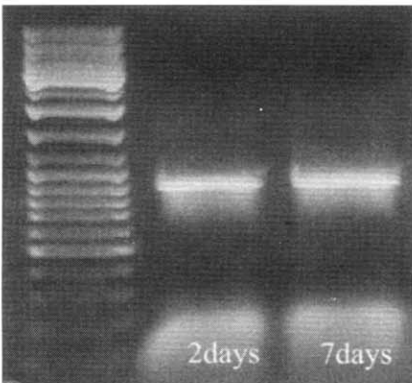


Figure 5

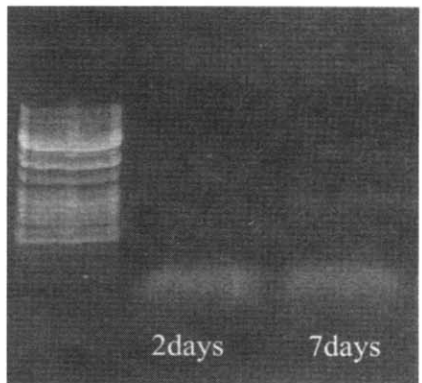


Figure 6

사진부도 (II)

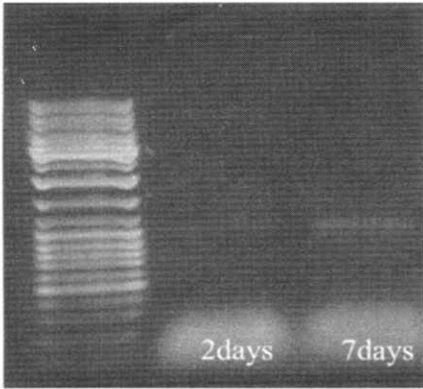


Figure 7

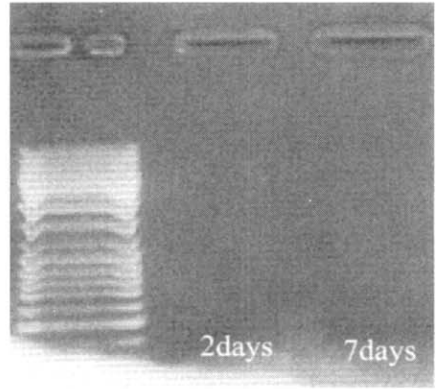


Figure 8

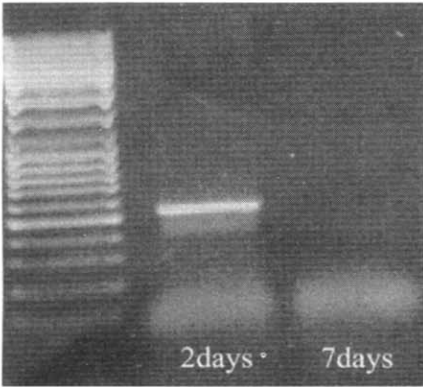


Figure 9

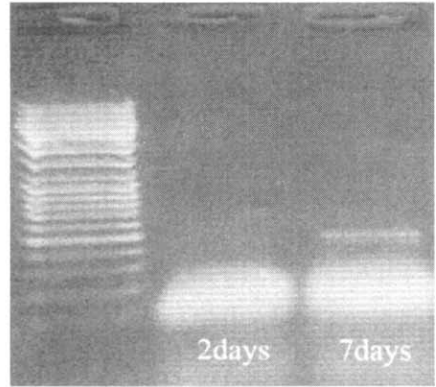


Figure 10

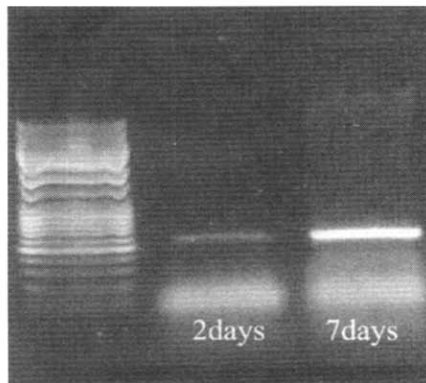


Figure 11

Expression of receptors of Vitamin D and cytokines in osteoclasts differentiated by M-CSF and ODF

Soo-mi Seong¹, Heung-sik Um¹, Sung-hee Ko², Kyung-mi Woo³, Beom-seok Chang¹

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Kangnung National University

²Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, Kangnung National University

³Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Kangnung National University

The primary cause of tooth loss after 30 years of age is periodontal disease. Destruction of alveolar bone by periodontal disease is done by bone resorbing activity of osteoclasts. Understanding differentiation and activation mechanism of osteoclasts is essential for controlling periodontal disease. The purpose of this study is to identify the possible effects of Vitamin D and cytokines affecting osteoclasts and its precursor cells.

Four to six week-old mice were killed and humerus, radius, tibia and femur were removed aseptically and washed two times with Hank's solution containing penicillin-streptomycin and then soft tissue were removed. Bone marrow cells were collected by 22 gauge needle. Cells were cultured in Hank's solution containing 1 mg/ml type II collagenase, 0.05% trypsin, 4mM EDTA. Supernatant solution was removed 5 times after 15 minutes of digestion with above mentioned enzyme solution, and remained bone particles were maintained in alpha-MEM for 15 minutes and 4°C temperature. Bone particles were agitated for 1 minute and supernatant solution containing osteoclast precursor cells were filtrated with cell stainer. These separated osteoclast precursor cells were dispensed with 100-mm culture dish by 1×10^7 cells unit and cultured in α -MEM containing 20 ng/ml recombinant human M-CSF, 30 ng/ml recombinant human soluble osteoclast differentiation factor and 10% fetal calf serum for 2 and 7 days. Total RNA of osteoclast precursor cells were extracted using RNeasy kit. One μ g of total RNA was reverse transcribed in 42°C for 30 minutes using SuperScriptII reverse transcriptase. Expression of transcribed receptors of each hormone and cytokine were traced with 1 μ l of cDNA solution by PCR amplification.

Vitamin D receptor was found in cells cultured for 7 days. TNF- α receptor was found in cells cultured for 2 days and amount of receptors were increased by 7 days. IL-1 type I receptor was not found in cells cultured 2 and 7 days. But, IL-1 receptor type II was found in cells cultured for 2 days. TGF- $\alpha\beta$ type I receptor was found in cells cultured 2 and 7 days, and amount of receptors were increased by 7 days of culture. These results implies Vitamin D and cytokines can affect osteoclasts directly, and affecting period in differentiation cycle of osteoclasts is different by Vitamin D and cytokines.

key words: Macrophage Colony-Stimulating Factor, Osteoclast Differentiation Factor, Osteoclast, Vit D, Cytokine