

Increase in Intracellular Calcium is Necessary for RANKL Induction by High Extracellular Calcium

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

Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, College of Dentistry, Dental Research Institute, Seoul National University

(Received January 19, 2005 ; Accepted February 24, 2005)

Recently, we reported that high extracellular calcium increased receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression via p44/42 mitogen-activated protein kinase (p44/42 MAPK) activation in mouse osteoblasts. However, the mechanism for p44/42 MAPK activation by high extracellular calcium is unclear. In this study, we examined the role of intracellular calcium increase in high extracellular calcium-induced RANKL induction and p44/42 MAPK activation. Primary cultured mouse calvarial osteoblasts were used. RANKL expression was highly induced by 10 mM calcium treatment. Ionomycin, a calcium ionophore, also increased RANKL expression and activated p44/42 MAPK. U0126, an inhibitor of MEK1/2, an upstream activator of p44/42 MAPK, blocked the RANKL induction by both high extracellular calcium and ionomycin. High extracellular calcium increased the phosphorylation of proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2), one of the known upstream regulators of p44/42 MAPK activation. Bisindolylmaleimide, an inhibitor of protein kinase C, did not block RANKL induction and p44/42 MAPK activation induced by high extracellular calcium. 2-Aminoethoxydiphenyl borate, an inhibitor of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, blocked the RANKL induction by high extracellular calcium. It also partially suppressed the activation of Pyk2 and p44/42 MAPK. Cyclosporin A, an inhibitor of calcineurin, also inhibited high calcium-induced RANKL expression in dose dependent manner. However, cyclosporin A did not affect the activation of Pyk2 and p44/42 MAPK by high extracellular calcium treatment. These results suggest that 1) the increase in intracellular calcium via IP3-mediated calcium release is necessary for RANKL induction by high extracellular calcium treatment, 2) Pyk2 activation, but not protein

kinase C, following the increase in intracellular calcium might be involved in p44/42 MAPK activation, and 3) calcineurin-NFAT activation by the increase in intracellular calcium is involved in RANKL induction by high extracellular calcium treatment.

Keywords: High extracellular calcium, RANKL, p44/42 MAPK, Intracellular calcium, Pyk2, Calcineurin

서 론

골격의 형태와 양을 유지하기 위한 골개조는 골형성과 골흡수가 조화되어 이루어지며 다양한 hormones, cytokines, growth factors에 의해 조절된다(Roodman, 1996). 파골세포의 분화와 활성화가 골모세포와 파골세포 전구세포 간의 직접적 세포상호작용에 의해 이루어진다고 알려진 이래(Suda 등, 1992), 많은 분자들이 후보물질로 거론되어 왔으나 결정적 역할을 담당하는 인자가 근래에 밝혀졌다. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)는 골모세포의 세포막표면에 발현되어 파골세포 전구세포 표면의 수용체인 RANK에 결합하여 파골세포의 분화와 활성화를 유도하며, 파골세포 전구세포 배양에 macrophage-colony stimulating factor와 RANKL을 첨가하면 파골세포가 생성됨이 알려져 RANKL이 골모세포와 파골세포 전구세포간 직접적인 세포 상호작용에 관련되는 인자로 설명되었다(Lacey 등, 1998; Yasuda 등, 1998). RANKL은 파골세포 전구세포에서 파골세포로의 분화를 촉진시키고, 파골세포의 활성화와 생존율을 증가시키는 효과를 가져 파골세포 생성과 기능에 필수적인 인자로 여겨지고 있다(Matsuzaki 등, 1998; Quinn 등, 1998).

칼슘은 세포 분비, 유전자 발현, 화학주성, 세포증식 및 분화, 세포사 등 다양한 과정을 조절하는데 관여한다(Brown

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

과 MacLeod, 2001). 특히 골조직에서는 골흡수가 진행될 때 파골세포와 골조직 사이의 칼슘농도가 40 mM까지도 높아지며, 파골세포와 골모세포 모두 세포외칼슘을 감지하는 기전을 가지고 있으므로, 고농도 세포외칼슘이 골개조에 조절작용을 나타낼 것으로 생각되고 있다(Kameda 등, 1998; Yamaguchi 등, 1998a). 고농도 세포외칼슘이 파골세포 분화에 미치는 효과에 대해서는 아직 논란이 많으나, 골모세포와 골수세포의 혼합배양에 고농도 세포외칼슘을 첨가해주면 파골세포의 분화가 증가하며, 이 과정에서 골모세포의 RANKL 발현 증가가 관련되는 것으로 알려졌다(Takami 등, 2000; Shin 등, 2003). 또한 Kim 등(2003a)은 생쥐 골모세포에서 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현 증가에는 p44/42 mitogen-activated kinase(p44/42 MAPK)의 활성화가 필요하다고 하였다. 한편 골모세포에 calcium ionophore를 처리하여 세포내칼슘 농도를 높이면 p44/42 MAPK 의존적으로 RANKL 발현이 증가한다고 보고되었다(Kim 등, 2003b). 또한 고농도 세포외칼슘은 골모세포의 세포내칼슘을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Tsai 등, 2004).

세포외칼슘을 감지하고 세포내 신호를 전달하는 수용체로 알려진 calcium sensing receptor(CaSR)는 G protein-coupled receptor(GPCR) superfamily에 속하며, 부갑상선 세포를 포함한 다양한 세포에 존재하는 것으로 알려져 있다(Brown과 MacLeod, 2001). 부갑상선 세포에 존재하는 CaSR과 동일한 CaSR이 골모세포에 존재하는지에 대해 아직 논란이 있지만, 그럼에도 불구하고 고농도 세포외칼슘에 대한 골모세포의 반응은 GPCR을 통한 반응과 유사한 것으로 보고되고 있다(Yamaguchi 등, 1998b; Pi 등, 2000; Kim 등, 2003a). GPCR을 통한 p44/42 MAPK 활성화 기전은 아직 잘 밝혀져 있지는 않으나, 근래에는 epidermal growth factor receptor(EGFR)와 같은 receptor tyrosine kinase의 transactivation을 통해 p44/42 MAPK가 활성화됨이 많이 보고되고 있다(Wetzker와 Böhmer, 2003). GPCR이 EGFR을 transactivation하는 과정에 세포내칼슘 증가, proline-rich tyrosine kinase 2(Pyk2), protein kinase C(PKC), Src, 활성화산소종 등이 관여함이 보고된 바 있다(Wetzker와 Böhmer, 2003). 따라서 본 연구에서는 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현과 p44/42 MAPK 활성화에 세포내칼슘 증가와 Pyk2 인산화가 관여하는지 알아보려고 하였다.

실험재료 및 방법

실험 재료

ICR 생쥐는 샘타코(오산시, 대한민국)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), crude collagenase, trypsin-EDTA 등

은 Gibco laboratories(Grand Island, NY, USA)에서, plastic tissue culture wares는 Corning Inc. (Corning, NY, USA)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 사용된 primer와 TaKaRa Taq™ polymerase는 TaKaRa (Otsu, Japan)에서, easy-BLUE™은 iNtRON biotechnology (서울, 대한민국)에서 구입하였다. U0126은 Promega (Madison, WI, USA)에서, PhosphoPlus p44/42 MAPK Antibody Kit는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-human phospho-Pyk2 antibody는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)에서, anti-human Pyk2 antibody, 2-aminoethoxydiphenyl borate(2-APB), ionomycin, cyclosporin A, bisindolylmaleimide는 Sigma-Aldrich Korea (용인시, 대한민국)에서 구입하였다.

골모세포의 분리 및 배양

골모세포는 생후 2-3일된 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 골모세포의 형질을 가진 세포가 많은 것으로 알려진 IV~VI군의 세포를 모아 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였으며, 일차 계대배양 후 각 실험에 사용하였다.

RANKL RT-PCR

골모세포를 60 mm dish에 5×10^5 개 씩 분주하고 다음 날 1% FBS가 함유된 DMEM으로 배양액을 바꾼 후 고농도 세포외칼슘(10 mM), ionomycin (1 μ M)은 8시간 동안 처리하였으며 MEK1/2 억제제인 U0126, PKC 억제제인 bisindolylmaleimide, IP3 receptor 억제제인 2-APB, calcineurin 억제제인 cyclosporin A를 처리하는 경우에는 다른 약물처리 1시간 전부터 첨가하여 배양하였다.

배양이 끝난 세포로부터 easy-BLUE™을 이용하여 total RNA를 분리하였으며, 1 μ g의 total RNA로부터 1 U superscript reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하고, 이 중 10%의 cDNA를 이용하여 2 U의 Takara Taq, PCR buffer, 0.8 mM dNTP, 100 pM의 primer가 혼합된 용액 50 μ l에서 PCR을 시행하였다. PCR 조건과 primer서열은 Table 1과 같다. PCR이 끝난 후 10 μ l를 1.2% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide로 염색하여 PCR 산물을 확인하였다.

p42/44 MAP kinase, Pyk2의 Western blot 분석

골모세포를 60 mm dish에 5×10^5 개 씩 분주하고 다음 날 FBS가 함유되지 않은 DMEM으로 배양액을 바꾸고 18시간 배양하였다. 그 후 U0126, bisindolylmaleimide, 2-APB, cyclosporin A 등으로 1시간 전처리하거나 하지

Table 1. Primer sequences and PCR condition

Gene (product size)	Primer sequence	PCR condition
RANKL (750 bp)	F: 5'-ATCAGAAGACAGCACTCACT-3' R: 5'-ATCTAGGACATCCATGCTAATGTTTC-3'	95°C, 30"; 45.5°C, 30"; 72°C, 1' 30 cycles
β -actin (366 bp)	F: 5'-GGACTCCTATGGTGGGTGACGAGG-3' R: 5'-GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGAT-3'	95°C, 30"; 58°C, 30"; 72°C, 1' 23 cycles
GAPDH (452 bp)	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	95°C, 30"; 55°C, 30"; 72°C, 1' 35 cycles

않고 고농도 세포외칼슘(10 mM)을 5~30분간 처리한 후 p44/42 MAPK 또는 Pyk2가 활성화되는지 확인하기 위해 Western blot 분석을 시행하였다. Phosphate-buffered saline에 두 번씩 세척하고 세포를 PBS-TDS lysis buffer (0.01 M Na_2HPO_4 , pH 7.2; 0.9% NaCl; 1% Triton x-100; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% sodium dodecyl sulfate; 0.2% sodium azide; 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sodium fluoride)에서 lysis시켰다. 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 supernatant를 모아서 BCA kit을 이용해서 단백질 농도를 측정하였다. 20 μg 의 단백질 샘플을 4~12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gradient gel에 전기영동하고, PVDF membrane에 electrotransfer하였다.

p44/42 MAPK, 활성화된 형태인 phospho-p44/42 MAPK, Pyk2와 활성화된 형태인 phospho-Pyk2에 대한 일차항체를 이용하여 immunoblotting을 시행하였으며, 마지막 단계에서 Supersignal chemiluminescent substrate를 넣어 반응시킨 후 전산화영상장치인 Las plus(Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 산물을 확인하였다.

실험 결과

골모세포에 10 mM 세포외칼슘을 처리해준 경우 기존의 보고(Kim 등, 2003a)에서와 같이 RANKL 발현이 크

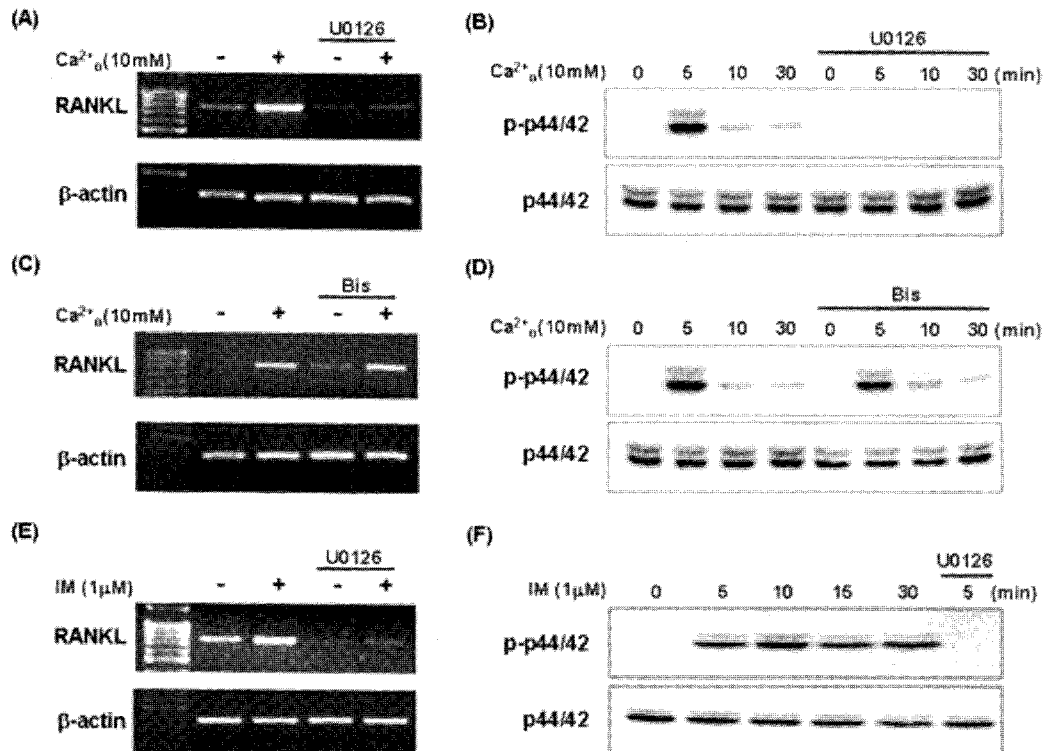


Fig. 1. High extracellular calcium and ionomycin increased RANKL expression via activation of p44/42 MAPK but not via protein kinase C activation. (A, C, E) Mouse calvarial osteoblasts were exposed to 10 mM extracellular calcium or 1 μM ionomycin (IM) for 8 h in the presence or absence of 20 μM U0126 or 1 μM bisindolylmaleimide (Bis). Then RANKL expression levels were analyzed by semiquantitative RT-PCR. (B, D, F) Osteoblasts were serum starved and exposed to 10 mM extracellular calcium or 1 μM IM for indicated times in the presence or absence of 20 μM U0126 or 1 μM Bis. Then the levels of phosphorylated and total p44/42 MAPK were examined by Western blot analysis.

게 증가되었으며, p44/42 MAPK의 활성화를 유도하였다 (Fig. 1A,B). 이러한 RANKL 발현 증가는 MEK1/2 억제제인 U0126을 처리하여 p44/42 MAPK 활성화를 억제하면 거의 완전히 억제되었다. Takami 등(2000)은 이러한 고농도 세포외칼슘의 효과가 세포내 칼슘 증가/PKC 활성화에 의한 것이라고 했기 때문에, PKC 억제제인 bisindolylmaleimide를 첨가하고 고농도 세포외칼슘의 효과를 관찰하였다. 그러나 PKC 억제제는 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현과 p44/42 MAPK 활성화에는 별다른 효과를 미치지 않았다(Fig. 1C,D). 세포내칼슘 증가가 RANKL 발현을 유도하는지 확인하고자 calcium ionophore인 ionomycin을 처리해준 경우 RANKL 발현이 크게 증가하였으며, 이러한 발현 유도효과는 U0126에 의해 억제되었다(Fig. 1E). 또한 ionomycin도 p44/42 MAPK 활성화를 유도하였으나, 고농도 세포외칼슘을 처리해준 경우 5분에 최대로 활성화되었다가 그 이후 감소되는 양상을 보이는데 반해 ionomycin은 30분까지 지속적으로 p44/42 MAPK 활성화 상태를 유지하였다(Fig. 1F).

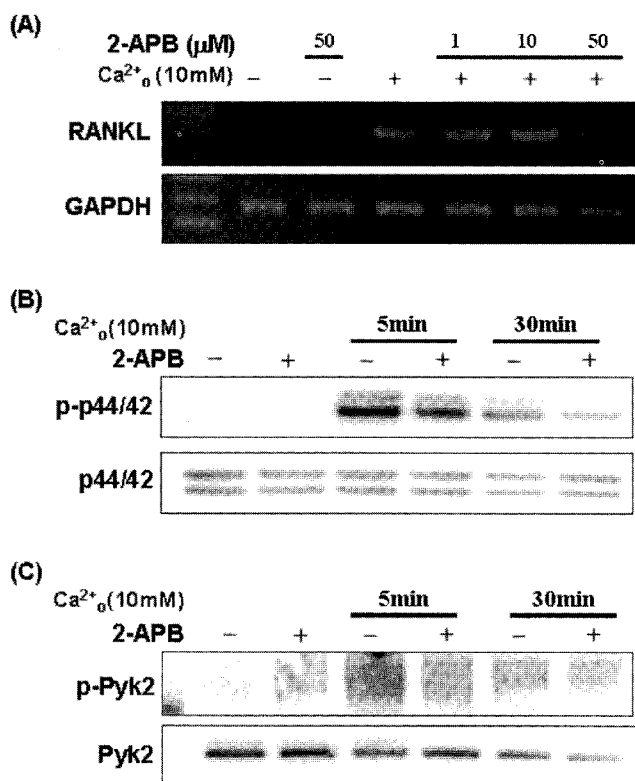


Fig. 2. The increase in intracellular calcium via inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium release is involved in RANKL induction by high extracellular calcium. (A) Mouse calvarial osteoblasts were exposed to 10 mM extracellular calcium for 8 h in the presence or absence of 1~50 μ M 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Then RANKL expression levels were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. (B, C) Osteoblasts were serum starved and exposed to 10 mM extracellular calcium for indicated times in the presence or absence of 50 μ M 2-APB. Then the levels of phosphorylated and total p44/42 MAPK(B) or Pyk2(C) were examined by Western blot analysis.

고농도 세포외칼슘이 세포내칼슘을 증가시키는 것으로 알려져 있고(Tsai 등, 2004), GPCR을 통해 세포내칼슘이 증가되는 경로 중 하나로 IP3 수용체를 통해 세포내 저장소에서 칼슘이 유리되는 것이 잘 알려져 있으므로 IP3 수용체 억제제인 2-APB를 처리하여 그 효과를 관찰하였다. 2-APB는 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현 증가를 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 2A). 또한 2-APB는 고농도 세포외칼슘에 의한 p44/42 MAPK 활성화 정도를 일부 감소시켰다(Fig. 2B). GPCR이 EGFR을 transactivation하는 과정에 Pyk2 활성화가 관여하며, 세포내칼슘 증가에 의해 Pyk2 활성화가 유도되는 것으로 알려져 있으므로(Tahara 등, 2001; Wetzker와 Böhrer, 2003), 고농도 세포외칼슘과 2-APB 처리가 Pyk2활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. p44/42 MAPK와 비슷하게 고농도 세포외칼슘 처리 후 5분째 Pyk2 인산화가 증가되었으며, 2-APB에 의해 그 정도가 감소되었다(Fig. 2C).

세포내칼슘이 증가하면 calcineurin이 활성화되어 nuclear factor of activated T cells(NFAT)의 인산화를 유도하고

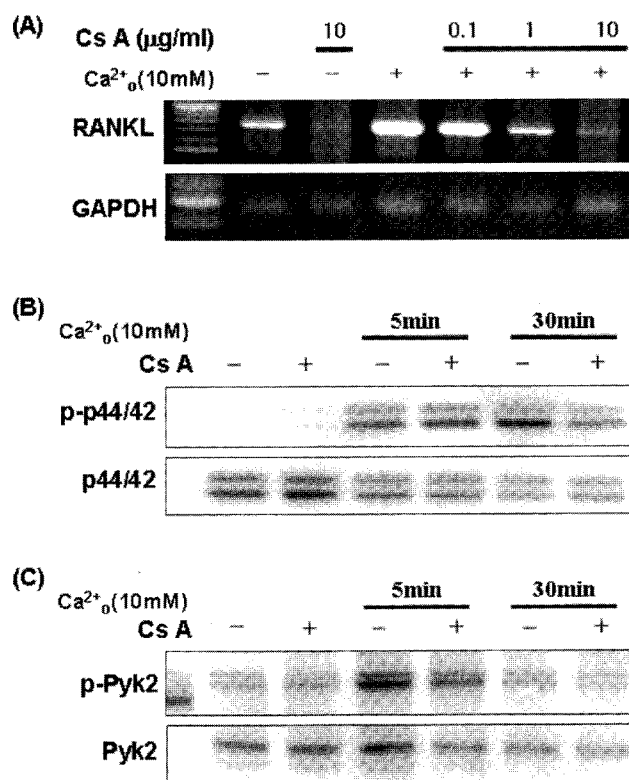


Fig. 3. Activation of calcineurin by increase in intracellular calcium is involved in RANKL induction by high extracellular calcium. (A) Mouse calvarial osteoblasts were exposed to 10 mM extracellular calcium for 8 h in the presence or absence of 0.1~10 μ g/ml cyclosporin A (Cs A). Then RANKL expression levels were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. (B, C) Osteoblasts were serum starved and exposed to 10 mM extracellular calcium for indicated times in the presence or absence of 10 μ g/ml Cs A. Then the levels of phosphorylated and total p44/42 MAPK(B) or Pyk2(C) were examined by Western blot analysis.

핵으로의 이동을 촉진하여 여러 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으므로(Hogan 등, 2003), calcineurin 억제제로 작용하는 cyclosporin A를 처리하여 그 효과를 관찰하였다. Cyclosporin A도 농도의존적으로 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현을 크게 억제하였으며, 또한 RANKL의 basal expression도 감소시켰다(Fig. 3A). 그러나 cyclosporin A는 p44/42 MAPK, Pyk2의 활성화에는 별다른 효과를 미치지 않았다(Fig. 3B,C).

고 찰

골모세포와 골수세포의 배양에 고농도 세포외칼슘을 처리하면 다른 파골세포 분화촉진 효소를 첨가해주지 않아도 파골세포 분화가 촉진되며 이 과정에 골모세포에서 RANKL의 발현이 증가시키므로, RANKL이 고농도 세포외칼슘의 골개조 조절작용의 중요한 매개인자로 작용할 것으로 제시되었다(Takami 등, 2000; Shin 등, 2003). 골모세포에서 RANKL의 발현을 증가시키는 신호전달경로는 대개 1,25-(OH)₂vitaminD₃ 수용체, cAMP/Protein kinase A, gp130-STAT3, 세포내칼슘/PKC 등의 4가지 경로로 분류가 되어왔다(Takahashi 등, 1999). 그러나 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현은 p44/42 MAPK의존적으로 알려져 있으며(Kim 등, 2003a), 최근 Nishida 등(2005)은 1,25-(OH)₂vitaminD₃와 dexamethasone처리에 의한 RANKL 발현증가가 p44/42 MAPK 의존적이라고 하여, 골모세포에서 RANKL 발현 조절과정에 p44/42 MAPK 활성화가 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 고농도 세포외칼슘에 의한 p44/42 MAPK 활성화 기전을 알아보고자 하였다. CaSR을 발현하는 세포에 고농도 세포외칼슘을 처리한 경우 phospholipase C와 PKC 활성화를 통해 p44/42 MAPK 활성화가 이루어진다고 알려져 있으나(Kifor 등, 2001; Sakwe 등, 2004), 본 연구에서는 PKC 억제제가 p44/42 MAPK 활성화와 RANKL 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 생쥐 골모세포에는 CaSR이 발현되지 않으며, 다른 calcium-sensing mechanism이 존재할 것이라는 선행 보고와 관련된 것으로 생각된다(Pi 등, 2000; Kim 등, 2003a). 비록 생쥐 골모세포에 CaSR은 관찰되지 않아도 고농도 세포외칼슘에 대한 반응은 GPCR을 통한 반응과 유사한 것으로 보고되었다(Pi 등, 2000). GPCR을 통해 p44/42 MAPK가 활성화되는 경로로 오랫동안 알려졌던 경로는 G_{q11}/phospholipase C-β/PKC/Raf 경로였으나, 근래에는 EGFR과 같은 receptor tyrosine kinase의 transactivation이 중요한 경로로 작용한다는 보고가 많으며, GPCR이 EGFR을 transactivation 하는 매개 분자로 src과 Pyk2가 제시되고 있다(Wetzker와 Böhmer, 2003). 전립선암세포에 고농도 세포외칼슘을 처리하면

EGFR 활성화를 통해 p44/42 MAPK가 활성화된다는 보고(Yano 등, 2004)는 골모세포에서 고농도 세포외칼슘에 의한 p44/42 MAPK 활성화도 EGFR transactivation을 통해 일어날 수 있음을 시사하였다. 또한 심근세포에서 세포내칼슘이 증가되면 Pyk2 인산화를 통해 EGFR을 활성화하고 그를 통해 p44/42 MAPK 활성화를 야기한다는 보고(Tahara 등, 2001)와 골모세포에서 기계적 자극에 의한 p44/42 MAPK 활성화 과정이 Pyk2 인산화에 의해 매개된다는 보고(Boutahar 등, 2004)로 미루어볼 때 골모세포에서도 Pyk2 인산화가 p44/42 MAPK 활성화에 관련될 수 있을 것으로 생각되었다. 본 연구에서 calcium ionophore에 의해서 p44/42 MAPK 활성화와 RANKL 발현증가가 이루어지며, 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현 증가가 2-APB에 의해 거의 억제된 결과는, 골모세포에서 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현 증가에는 IP3를 매개로 세포내 저장소에서 칼슘이 유리됨에 의해 세포내칼슘 농도가 증가됨이 필요함을 시사하고 있다. 또한 고농도 세포외칼슘을 처리했을 때 p44/42 MAPK 활성화와 유사한 시간대에 Pyk2 인산화가 증가하였으며, 2-APB 처리에 의해 Pyk2 인산화와 p44/42 MAPK 활성화가 부분적으로 억제되었으므로, 고농도 세포외칼슘에 의한 p44/42 MAPK 활성화에 Pyk2가 관여할 수 있을 것으로 생각된다. 2-APB에 의한 RANKL 발현 억제효과에 비해 p44/42 MAPK나 Pyk2 인산화에 대한 억제 효과는 적게 나타났으며, 그 차이가 나타나는 이유는 명확하지 않았다. 한가지 가능성은 고농도 세포외칼슘 처리에 의해 증가된 세포내칼슘이 p44/42 MAPK 활성화 이외에 또다른 타겟에 작용하여 RANKL 발현을 조절할 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

세포내칼슘이 증가하면 calmodulin과 결합하여 calcineurin의 phosphatase 활성을 활성화시키고 그 하부의 NFAT을 탈인산화시켜 핵 내로의 이동을 촉진하여 여러 유전자의 발현을 조절한다(Hogan 등, 2003). Calcineurin 억제제인 cyclosporin A가 사람 골수기질세포에서 RANKL의 발현을 약간 증가시킨다는 보고가 있어(Hofbauer 등, 2001), 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL 발현에 cyclosporin A가 미치는 효과를 관찰하였다. Cyclosporin A는 고농도 세포외칼슘에 의한 RANKL의 발현 증가를 거의 완전히 억제하였으며, RANKL basal expression 정도도 억제하였다. 그러나 Pyk2 인산화와 p44/42 MAPK 활성화에는 별다른 억제효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 2-APB를 고농도 세포외칼슘과 함께 처리한 경우, p44/42 MAPK 활성화는 부분적으로만 억제되었음에도 RANKL 발현은 거의 완전히 억제되는데 있어서 calcineurin/NFAT 활성화 저하도 관련되었을 가능성이 있음을 시사하는 결과로 생각된다. Calcineurin/NFAT 활성화가 p44/42 MAPK 활성화 없이도 RANKL 발현을 증가시킬 수 있는지 명확하지는 않으나, U0126을 처리한 경우 고농도 세포외

칼슘에 의한 RANKL 발현이 거의 완전히 저해되는 것으로 보아 그러한 가능성은 적을 것으로 생각된다. 최근의 보고들은 활성화된 p44/42 MAPK가 AP-1 활성화를 통하거나, NFAT의 인산화를 통해, 또는 NFAT transcription activation complex에 p44/42 MAPK가 포함되어 NFAT에 의한 transcription activity를 증가시킴을 제시하였다(Sanna 등, 2005; Yang 등, 2005). 현재까지 RANKL promoter에서 NFAT 또는 AP-1 결합 부위 존재에 대한 보고는 없었으며, calcineurin/NFAT과 p44/42 MAPK가 RANKL 발현을 어떻게 조절하는지 현재로는 설명할 수 없지만, 본 연구결과로 보아 이 두가지가 상호의존적으로 RANKL 발현 조절에 관여될 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 종합하면, 골모세포에 고농도 세포외칼슘을 처리하면, 세포내 칼슘 저장소에서 칼슘이 유리되어 세포내칼슘 농도가 증가되며, 이를 통해 Pyk2 인산화와 p44/42 MAPK 활성화가 일어나고, calcineurin/NFAT이 활성화되어 RANKL 발현이 증가되는데 기여할 것으로 생각되었다.

감사의 글

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

참고문헌

- Boutahar, N., Guignandon, A., Vico, L. and Lafage-Proust, M.H.: Mechanical strain on osteoblasts activates auto-phosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation. *J. Biol. Chem.* **279**:30588-30599, 2004.
- Brown, E.M. and MacLeod, R.J.: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**:239-297, 2001.
- Hofbauer, L.C., Shui, C., Riggs, B.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., O'Brien, T. and Khosla, S.: Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**:334-339, 2001.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A.: Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**:2205-2232, 2003.
- Kameda, T., Mano, H., Yamada, Y., Takai, H., Amizuka, N., Kabori, 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.
- Kifor, O., MacLeod, R.J., Diaz, R., Bai, M., Yamaguchi, T., Yao, T., Kifor, I. and Brown, E.M.: Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**:F291-F302, 2001.
- 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-kappaB ligand induction by high extracellular calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:729-735, 2003a.
- Kim, Y.H., Pang, S.J., Jun, J.H., Baek, J.H. and Kim, G.S.: The role of p44/42 MAPK activation in Ca²⁺/PKC-induced RANKL expression. *Kor. J. Oral Anat.* **27**:55-63, 2003b.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelly, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliot, R., Colombero, A., Elliot, 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. and Boyl, W.J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**:165-176, 1998.
- Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. and Suda, T.: Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:199-204, 1998.
- Nishida, S., Tsubaki, M., Hoshino, M., Namimatsu, A., Uji, H., Yoshioka, S., Tanimori, Y., Yanae, M., Iwaki, M. and Irimajiri, K.: Nitrogen-containing bisphosphonate, YM529/ONO-5920 (a novel minodronic acid), inhibits RANKL expression in a cultured bone marrow stromal cell line ST2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**:91-97, 2005.
- Pi, M., Garner, S.C., Flannery, P., Spurney, R.F. and Quarles, L.D.: Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**:3256-3263, 2000.
- 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.
- Roodman, G.D.: Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr. Rev.* **4**:308-332, 1996.
- Sakwe, A.M., Larsson, M. and Rask, L.: Involvement of protein kinase C-alpha and -epsilon in extracellular Ca(2+) signalling mediated by the calcium sensing receptor. *Exp. Cell. Res.* **97**:560-573, 2004.
- Sanna, B., Bueno, O.F., Dai, Y.S., Wilkins, B.J. and Molkenin, J.D.: Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol. Cell. Biol.* **25**:865-878, 2005.
- Shin, M.M., Kim, Y.H., Kim, S.N., Kim, G.S. and Baek, J.H.: High extracellular Ca²⁺ alone stimulates osteoclast formation but inhibits in the presence of other osteoclastogenic factors. *Exp. Mol. Med.* **35**:167-174, 2003.
- Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* **13**:66-80, 1992.

- Tahara, S., Fukuda, K., Kodama, H., Kato, T., Miyoshi, S. and Ogawa, S.: Potassium channel blocker activates extracellular signal-regulated kinases through Pyk2 and epidermal growth factor receptor in rat cardiomyocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **8**:1554-1563, 2001.
- Takahashi, N., Udagawa, N. and 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**:449-455, 1999.
- 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-kappaB ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* **141**:4711-4719, 2000.
- 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.
- Wetzker, R. and Bohmer, F.D.: Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:651-657, 2003.
- Yamaguchi, T., Kifor, O., Chattopadhyay, N. and Brown, E.M.: Expression of extracellular calcium(Ca^{2+})_o-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**:753-757, 1998a.
- Yamaguchi, T., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Butters, R.R. Jr., Sugimoto, T. and Brown, E.M.: Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium(Ca^{2+})_o-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**:1530-1538, 1998b.
- Yang, T.T., Xiong, Q., Graef, I.A., Crabtree, G.R. and Chow, C.W.: Recruitment of the extracellular signal-regulated kinase/ribosomal S6 kinase signaling pathway to the NFATc4 transcription activation complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**:907-920, 2005.
- Yano, S., Macleod, R.J., Chattopadhyay, N., Tfelt-Hansen, J., Kifor, O., Butters, R.R. and Brown, E.M.: Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* **35**:664-672, 2004.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:3597-3602, 1998.