

## NFATc1 and NFATc3 is Involved in the Expression of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand in Activated T Lymphocytes

Sun-Jae Heo, Hyun-Jung Park, and Jeong-Hwa Baek\*

Department of Molecular Genetics, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea

(received February 15, 2013 ; revised February 27, 2013 ; accepted February 28, 2013)

Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) is an essential cytokine for osteoclast differentiation, activation and survival. T lymphocytes such as T<sub>H17</sub> cells, a subset of T helper cells that produce IL-17, play an important role in rheumatoid arthritic bone resorption by producing inflammatory cytokines and RANKL. It has not yet been clearly elucidated how T cell activation induces RANKL expression. T cell receptor activation induces the activation of nuclear factor of activated T cell (NFAT) and expression of its target genes. In this study, we examined the role of NFAT in T cell activation-induced RANKL expression. EL-4, a murine T lymphocytic cell line, was used. When T cell activation was induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin, RANKL expression increased in a time-dependent manner. In the presence of cyclosporin, an inhibitor of NFAT activation, this PMA/ionomycin-induced RANKL expression was blocked. Overexpression of either NFATc1 or NFATc3 induced RANKL expression. Chromatin immunoprecipitation results demonstrated that PMA/ionomycin treatment induced the binding of NFATc1 and NFATc3 to the mouse RANKL gene promoter. These results suggest that NFATc1 and NFATc3 mediates T cell receptor activation-induced RANKL expression in T lymphocytes.

\*Correspondence to: Jeong-Hwa Baek, Department of Molecular Genetics, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea, Tel: +82-2-740-8688, Fax: +82-2-741-3193, e-mail: baekjh@snu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Key words:** RANK ligand, T lymphocyte, NFATc1, NFATc3

### 서 론

뼈는 일생동안에 계속적으로 변하고, 형성되고, 교체되는 역동적인 조직이다. 한번 형성된 뼈는 조골세포와 파골세포가 관여하는 리모델링 과정을 겪으며 흡수되고 합성되는데 이는 성인에서 뼈의 구조와 기능을 조절하는 주된 대사 과정이다[1]. 파골세포는 단핵구/대식세포 계열의 조혈세포에서 유래한 조직 특이적 거대 다핵세포로 뼈, 상아질, 석회화된 연골을 파괴하는 역할을 한다. 전통적으로 파골세포는 주로 호르몬에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 파골세포와 면역세포는 사이토카인, 수용체, 세포내 신호물질, 전자인자와 같은 여러 조절에 관여하는 분자들을 공유하고 있다. 면역세포는 골수에서 유래하며 파골세포와 같은 미세 환경 속에서 발달하게 된다[2]. 파골세포의 분화는 단핵구/대식세포 계열의 파골세포 전구세포와 뼈에 존재하는 조골세포/골수기질세포의 세포 간 접촉에 의해 유도된다. 여기서 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)에 의한 신호전달이 필요하다. RANKL은 조골세포와 골수기질세포에서 주로 분비되지만 그 외에도 활성화된 T 림프구를 포함한 여러 다양한 종류의 세포에서도 발현된다[3-5].

T 림프구가 활성화 되면 세포 내 phospholipase C $\gamma$ 1 활성화가 일어나 inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)와 diacylglycerol 형성이 증가하고 IP3는 소포체로부터 칼슘 유출을 유도하여 세포 칼슘 농도 증가를 유도한다. 증가된 세포 내 칼슘이온은 calmodulin과 결합하여 calcineurin의 활성화

를 유도하고 그 결과 T 림프구에서 여러 가지 사이토카인 발현을 조절하는 전사인자인 nuclear factor of activated T cell (NFAT) 활성화를 유도한다[6-8].

RANKL은 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, 부갑상선호르몬, interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-7, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등 다양한 인자에 의해 발현이 촉진되며, 파골세포 전구세포 표면의 RANK에 결합해 파골세포 분화를 유도한다[9,10]. 류마티스 관절염 환자의 연골 활액과 활막에서 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ 의 발현 증가가 관찰되며, 염증성 사이토카인은 조골세포와 섬유모세포의 RANKL 발현을 증가시켜 뼈 흡수에 기여하는 것으로 알려져 있다[11].

Calcineurin은 칼슘의존성 단백질 인산가수분해효소로 NFAT 탈인산화를 유도하여 NFAT의 활성화 및 핵내 이동을 야기한다[12,13]. 면역억제제인 cyclosporin A (CsA)와 FK506은 calcineurin 활성을 저해하여 NFAT 활성화를 차단하므로 항원이나 세포분열촉진인자에 의해 야기되는 T 림프구 활성화를 저해하게 된다[14,15].

뼈와 면역체계의 연관성에 대한 중요한 예는 뼈의 파괴가 다발성으로 나타나는 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환이 대표적이다[16]. 활성화된 T 림프구에서 분비된 RANKL이 파골세포 전구세포에 작용하여 파골세포 분화 및 세포활성을 증가시켜 골파괴를 유도하는 것으로 알려져 있다[17,18]. 특히 IL-17을 생산하는 T도움세포(T<sub>H</sub>17 cell)는 염증성 사이토카인과 함께 RANKL을 분비하여 파골세포 분화를 촉진한다[19]. 그러나 T 림프구 활성화에 따른 RANKL 발현 증가 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 구강편평세포암종 세포에 CXCL13을 처리했을 때 RANKL 발현이 증가하며, 그 과정에서 NFAT가 관여한다는 논문이 최근 발표된 바 있다[20]. T 림프구가 활성화되면 세포 내 NFAT의 활성화 및 발현 증가가 나타나므로 활성화된 NFAT가 RANKL 발현을 촉진하는 전사인자로 작용할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 칼슘의 유입을 촉진하는 것으로 알려진 ionomycin과 protein kinase C의 활성화를 촉진하는 phorbol 12-myristate 13- acetate (PMA)를 사용하여 T 림프구 활성화를 유도하고[21,22], RANKL 발현 증가 및 그 과정에서 NFAT의 역할을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### EL-4 세포 배양

실험에는 생쥐 T 림프구 세포주인 EL-4 세포를 사용하였다. 세포는 10%의 소태아혈청과 100 U/ml penicillin (Thermo; Utah, USA), 5  $\mu$ g/ml plasmocin (Invivogen; CA, USA)이

포함된 HyQ-RPMI 1640 (Thermo)을 이용하여 배양하였다. EL-4 세포 활성화는 1 mM PMA, 1 mg/ml ionomycin 처리에 의해 유도하였으며, NFAT 활성화 억제를 위해 10  $\mu$ g/ml CsA (Sigma; MO, USA)를 첨가 배양하였다.

### 역전사효소 중합연쇄반응(RT-PCR)

NFATc1, NFATc3, RANKL 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자의 mRNA 발현 정도를 관찰하기 위해 easy-Blue™ Total RNA Extraction Kit (인트론 바이오테크놀로지; 성남, 한국)을 이용해 배양된 세포의 total RNA를 추출한 후, AccuPower RT premix (바이오니아; 대전, 한국)를 이용해 cDNA를 제작하였다. RANKL mRNA 발현 확인을 위한 semiquantitative PCR은 *i*-star Taq DNA polymerase(인트론바이오테크놀로지)를 이용하였으며, 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 확인하였다. Semiquantitative PCR에 사용된 프라이머 염기서열은 다음과 같았다; RANKL forward 5'-CAGGTTTGCAGGACTCGAC-3', reverse 5'-AGCAGGGAAGGGTTGGACA-3'; GAPDH forward 5'-TGAAGTTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3', reverse 5'-CGTGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'. 또한 NFATc1, NFATc3, RANKL mRNA의 정량적 관찰을 위해 SYBR premixEXTaq (Takara; Otsu, Japan)을 사용하여 real time PCR을 수행하였으며 사용된 프라이머 염기서열은 Table 1과 같다.

### Western blot 분석

세포를 인산염완충식염수로 세척하고 세포용해완충액 {10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaF, 1 mM , 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M pepstatin}을 이용하여 전 세포용해물(whole cell lysate)을 얻었다. 핵단백질 시료는 NEPER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE

**Table 1.** Sequence of primers used for real time PCR

Genes	Primer sequences
RANKL	F: 5'-CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3' R: 5'-CACCATCGCTTTCTCTGCTCT-3'
NFATc1	F: 5'-AATAACATGCGAGCCATCATC-3' R: 5'-TCACCCTGGTGTCTTCTCCTC-3'
NFATc3	F: 5'-TCATGGACTGCTGCAGTCT-3' R: 5'-GGAGCTGAAATGATGGTGA-3'
GAPDH	F: 5'-TCAATGACAACCTTTGTCAAGC-3' R: 5'-CCAGGGTTTCTTACTCCTTGG-3'

Biotechnology; IL, USA)를 이용하여 준비하였다. 단백질 정량은 modified Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories; CA, USA)를 이용하였다. 30 µg의 단백질을 5X Laemmli sample buffer에 섞은 후 10% SDS-PAGE에 전기영동하고 PVDF 막에 전기이동 시켰다. RANKL (R&D systems; MN, USA), NFATc1, NFATc3 (Santa Cruz; CA, USA)에 대한 일차항체와 이차항체인 rabbit anti-goat IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP (Thermo)를 차례로 반응시킨 후 항체가 결합한 단백질 밴드는 Supex reagent (다인바이오; 성남, 한국)와 LAS 1000 (Fugi photofilm; Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

### Transient transfection

EL-4 세포에서 NFATc1과 NFATc3의 과발현이 RANKL 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 이들 발현백터의 transient transfection을 시행하였다.  $2 \times 10^5$  cells/60 mm dish가 되도록 분주하고 세포가 70-80%정도 찼을 때 pcDNA3.1, NFATc1 발현백터[23] 또는 NFATc3 발현백터(pOTB7-NFATc3; Invitrogen; CA, USA)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection을 시행하였다. 24시간 후 total RNA를 수집하여 RT-PCR을 수행하거나 단백질 시료를 준비하여 Western blot 분석을 시행하였다.

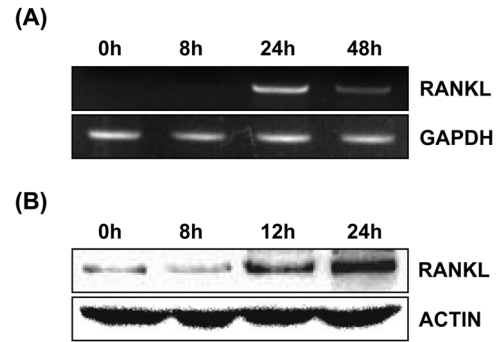
### 염색질 면역침강(ChIP) 분석

EL-4 cell에 PMA와 ionomycin을 24시간 처리한 후, 1% 포르말데히드로 세포를 고정하였다. 세포를 용해시킨 후 200-800 bp의 크기로 DNA가 절단되도록 초음파파쇄를 시행하였다. NFATc1 또는 NFATc3 일차항체와 protein G agarose로 면역침강을 시행하고 침전물에 포함된 DNA를 분리한 후 아래와 같은 프라이머를 사용해 생쥐 RANKL 프로모터의 -1070 bp에서 -858 bp 부위를 증폭시키고 1.2% agarose gel에서 PCR 산물을 확인하였다; forward 5'-GC-AAGCTCCAGGCCAGCCTAG-3', reverse 5'- CCAATAA-GACGGCTCAGCTG-3'[23].

## 결 과

### T 림프구 활성화에 의한 RANKL 발현 유도

활성화된 T 림프구에서 RANKL이 발현되는 시기를 확인하고자 EL-4 세포에 ionomycin과 PMA를 처리하고 0, 8, 24, 48시간 배양한 후 total RNA를 준비하여 RT-PCR을 시행하였다. Ionomycin과 PMA를 처리하지 않은 대조군(0시간)과 비교하여 24시간과 48시간 배양한 실험군에서 RANKL mRNA 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 1A). RANKL



**Fig. 1.** T cell activation by ionomycin and PMA increased expression levels of RANKL mRNA and protein. Activation of EL-4 cells was induced by 1 mM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mg/ml ionomycin, and the cells were incubated for the indicated periods. Then, semiquantitative RT-PCR (A) or Western blot analysis (B) were performed.

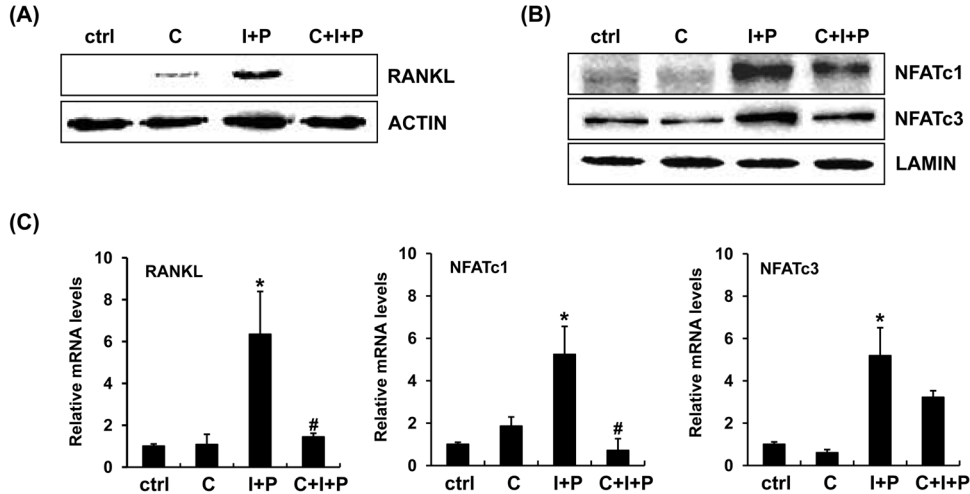
단백질의 발현을 관찰하기 위해 0, 8, 12, 24시간 시료로 Western blot 분석을 시행한 결과, 12시간부터 RANKL 발현 증가가 관찰되었으며 24시간에는 RANKL 단백질량이 더 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1B).

### NFAT 활성화 억제제가 RANKL 발현에 미치는 영향

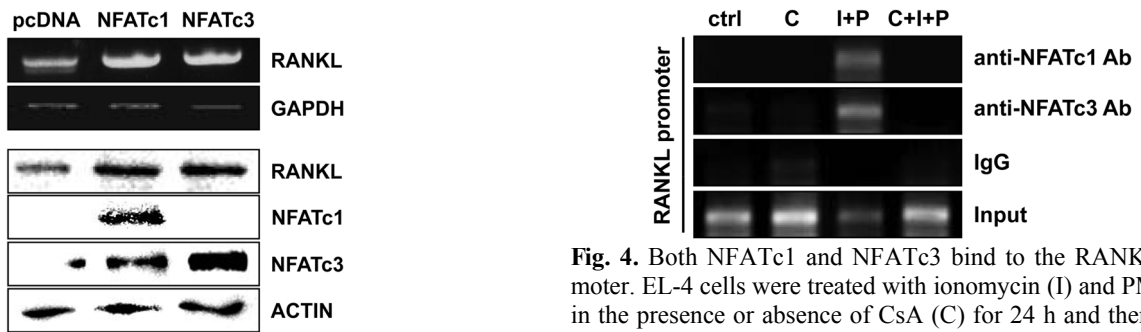
T 림프구 활성화에 의해 유도된 RANKL 발현에 NFAT이 관여하는지를 확인하기 위해 CsA를 처리하여 RANKL 발현의 변화를 관찰하였다. EL-4 세포에 CsA를 30분 전 처리하고 PMA와 ionomycin을 24시간동안 처리한 후, total RNA와 단백질을 얻어 real-time PCR과 Western blot 분석을 통해 RANKL과 NFAT의 발현을 확인하였다. PMA와 ionomycin에 의해 증가된 RANKL의 발현이 CsA 처리에 의해 감소하였다(Fig. 2A, 2C). 이것은 calcineurin 활성화가 억제되면서 하위 신호 단백질인 NFAT의 활성화가 저해되어 일어나는 현상으로 생각되었으므로 핵내 NFAT의 발현도 함께 관찰하였다. PMA와 ionomycin을 처리하면 핵내 NFATc1과 NFATc3 단백질의 양이 증가할 뿐 아니라 이들 유전자 mRNA 발현의 증가가 관찰되었으나 CsA를 처리하면 단백질과 mRNA 증가가 모두 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2B, 2C).

### NFATc1과 NFATc3 과발현이 RANKL 발현에 미치는 영향

앞의 결과는 활성화된 T 림프구에서의 RANKL 발현에 NFATc1과 NFATc3가 관여할 가능성을 제시하였으므로, EL-4 세포에 NFATc1 또는 NFATc3를 과발현시켜 RANKL 발현을 증가시키는지 관찰하였다. NFATc1 또는 NFATc3 과발현은 RANKL mRNA와 단백질 발현을 모두 증가시켰다(Fig. 3). 한편 NFATc1 과발현은 NFATc3 발현을 증



**Fig. 2.** Inhibition of NFAT activation by cyclosporin A blocked RANKL expression in activated T cells. EL-4 cells were treated with 1 mM PMA (P) and 1 mg/ml ionomycin (I) in the presence or absence of 10 µg/ml cyclosporin A (C) for 24 h. (A, B) Western blot analysis was performed using whole cell protein (A) or nuclear protein (B). (C) Real-time PCR was performed and relative mRNA levels were obtained by normalization of  $C_T$  values of RANKL, NFATc1 or NFATc3 genes to that of GAPDH. Data represent mean ± SD of triplicates (\*  $p < 0.01$ , compared to control(ctrl); #  $p < 0.01$ , compared to I+P).



**Fig. 3.** Overexpression of NFATc1 or NFATc3 increased RANKL expression. EL-4 cells were transiently transfected with NFATc1 or NFATc3 expression vectors and incubated for 24 h. Semi-quantitative RT-PCR (upper panel) and Western blot analysis (lower panel) were then performed.

가시켰으나 NFATc3 과발현은 NFATc1 발현에 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 NFATc1과 NFATc3가 RANKL의 발현을 유도할 수 있으며 NFATc3는 NFATc1에 의해 발현이 증가됨을 보여주었다.

**NFATc1과 NFATc3의 RANKL 프로모터 결합**

NFATc1과 NFATc3 과발현이 모두 RANKL 발현을 증가시켰으므로, 이들 전사인자가 RANKL 프로모터에 직접 결합하여 RANKL 전사를 조절하는지 알아보기 위해 ChIP 분석을 수행하였다. CsA가 있거나 없는 상태에서 EL-4 세포에 ionomycin과 PMA를 24시간 처리한 후 NFATc1과 NFATc3 일차 항체를 사용하여 ChIP를 시행하였다. 기존 보고[23]에서 NFAT이 결합하는 것으로 알려진 RANKL 프

**Fig. 4.** Both NFATc1 and NFATc3 bind to the RANKL promoter. EL-4 cells were treated with ionomycin (I) and PMA (P) in the presence or absence of CsA (C) for 24 h and then chromatin immunoprecipitation was performed using anti-NFATc1 antibody, anti-NFATc3 antibody or normal IgG. Using DNA fragments eluted from immunoprecipitates, RANKL promoter region spanning -1070 to -858 bp was amplified by PCR.

로모터 부위에 대해 PCR을 수행한 결과, 활성화된 EL-4 세포에서는 RANKL 프로모터에 대한 NFATc1과 NFATc3의 결합이 증가하였으나 CsA를 함께 처리한 세포에서는 NFATc1과 NFATc3의 결합 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 T 림프구의 활성화가 일어날 때 NFAT 전사인자가 활성화되어 핵으로 들어간 후 RANKL 프로모터에 직접 결합하여 RANKL 전사를 유도할 것을 시사한다.

**고찰**

본 실험에서는 생쥐 T 림프구 세포주인 EL-4 세포를 이용하여 전사인자인 NFATc1과 NFATc3가 T 림프구 활성화에 의해 유도되는 RANKL 발현에 관여하는지에 대해

알아보았다.

기존의 보고에서 EL-4 세포에 PMA와 ionomycin을 처리해 주면 NFAT의 발현이 농도에 비례해 증가하며 T 세포 활성화가 야기되는 것으로 알려져 있다[24]. 본 실험에서도 PMA와 ionomycin을 세포에 처리했을 때 NFATc1과 NFATc3 mRNA의 발현 증가가 관찰되었으며, 그와 비슷한 양상으로 RANKL 발현의 증가도 관찰되었다. 또한 CsA를 처리하여 NFAT 활성화를 저해한 경우 RANKL 발현이 차단되었으며, T 림프구 활성화를 유도하면 RANKL 프로모터에 NFATc1 및 NFATc3 결합이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 T 세포 활성화에 의해 유도된 RANKL 발현에서 NFAT 전사인자가 중요한 역할을 담당함을 시사한다.

NFAT은 세포내 칼슘 증가에 의해 활성화되며 표적 유전자의 전사를 유도한다[24]. CsA는 면역억제제로 세포 내에서 cyclophilin과 복합체를 이루어 칼슘 의존성 인산가수분해효소인 calcineurin을 억제함으로써 NFAT의 핵 내 이동과 NFAT에 의해 조절되는 유전자의 전사를 저해하는 역할을 한다[25-28]. 본 연구에서 PMA와 ionomycin은 NFATc1과 NFATc3 발현을 모두 증가시켰으며, CsA를 처리하여 NFAT 탈인산화를 저해하면 NFATc1과 NFATc3 뿐만 아니라 RANKL 발현도 차단되었다. 이러한 결과는 T 세포 활성화에 의한 RANKL의 발현은 세포내 칼슘 농도 증가에 의해 활성화되는 calcineurin-NFAT 신호전달을 필요로 함을 시사한다.

NFATc1과 NFATc3가 RANKL의 발현에 미치는 영향을 좀 더 직접적으로 알아보기 위해 NFATc1 또는 NFATc3 과발현을 유도하였을 때 두 경우 모두에서 RANKL mRNA와 단백질 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NFAT의 발현 또는 전사활성의 증가만으로도 T 세포에서 RANKL 발현을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 한편 EL-4 세포에 NFATc1을 과발현하면 NFATc1과 NFATc3의 발현이 모두 증가하나 NFATc3를 과발현하면 NFATc1에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 기존의 보고[23]와 동일한 것으로 T 림프구에서도 NFATc1이 NFATc3의 발현을 조절하는 전사인자로 작용할 수 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

본 연구에서 EL-4 세포의 활성화를 유도하면 RANKL 프로모터에 NFATc1과 NFATc3의 결합이 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 T 림프구에서 NFATc1과 NFATc3가 모두 RANKL의 발현 조절에 중요한 요소임을 의미하는 결과로 생각된다. 그러나 NFATc1과 NFATc3의 상대적 역할을 확인하기 위해서는 siRNA를 이용하여 이들 전사인자 각각에 대한 발현을 저해한 후 RANKL 발현에 미치는 영향을 확인하는 후속연구가 필요한 것으로 판단된다. 조골세포에 고농도 칼슘을 처리하여 RANKL 발현을 유도하는 경우

RANKL 프로모터에 NFATc3는 직접 결합하지만 NFATc1은 결합하지 않는다는 기존의 보고[23]와 달리 본 연구에서는 NFATc1도 RANKL 프로모터에 결합하는 것으로 나타났다. 이러한 차이가 나타나는 이유는 확실하지 않으나 사용된 세포의 차이(조골세포 대 T 림프구) 또는 사용된 세포의 자극의 차이(고농도 세포의 칼슘 대 PMA/ionomycin)로 인해 NFAT 전사인자의 번역후변화(posttranslational modification) 상태가 달라져 전사인자의 작용에 차이가 있었을 가능성이 있는 것으로 추정된다.

활성화된 T 세포에서 분비된 RANKL은 과골세포 전구 세포의 RANK에 결합해 과골세포의 분화와 활성화를 유발하여 골 흡수를 야기한다[1,29]. T 세포는 다양한 미생물로부터 숙주를 방어하고자 하는 면역반응을 매개하지만, 이에 따르는 골의 과도한 흡수는 치조골 흡수 같은 부작용을 야기할 수 있다. 따라서 앞으로 T 세포의 활성화와 분화에 미치는 영향은 최소화 하면서 과도한 RANKL 발현을 조절할 수 있는 조절 방법에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0021044).

## 참고문헌

- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
- Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:33-63.
- Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1240: E13-E18.
- Jun JH, Kim HK, Woo KM, Kim GS, Baek JH. Increase in intracellular calcium is necessary for RANKL induction by high extracellular calcium. *Int J Oral Biol.* 2005;30:9-15.
- Lee J, Kim K, Kim N. Negative regulators in RANKL-induced osteoclastogenesis. *Int J Oral Biol.* 2007;32:1-5.
- Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A.  $Ca^{2+}$ /calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311:1117-1132.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003; 17:2205-2232.

8. Oh-hora M, Rao A. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2009;11:612-619.
9. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275:768-775.
10. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:795-823.
11. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:292-304.
12. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 2000;80:1483-1521.
13. Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2004;266:1-16.
14. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976;6:468-475.
15. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40:1256-1265.
16. Okamoto K, Takayanagi H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:219.
17. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:144-150.
18. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999;402:304-309.
19. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003;170:2655-2662.
20. Yuvaraj S, Griffin AC, Sundaram K, Kirkwood KL, Norris JS, Reddy SV. A novel function of CXCL13 to stimulate RANK ligand expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2009;7:1399-1407.
21. Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J.* 1994;300:665-672.
22. Zhao Y, Koebis M, Suo S, Ohno S, Ishiura S. Regulation of the alternative splicing of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase1 (SERCA1) by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) via a PKC pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423:212-217.
23. Lee HL, Bae OY, Baek KH, Kwon A, Hwang HR, Qadir AS, Park HJ, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. High extracellular calcium-induced NFATc3 regulates the expression of receptor activator of NF-kappaB ligand in osteoblasts. *Bone.* 2011;49:242-249.
24. Boss V, Talpade DJ, Murphy TJ. Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J Biol Chem.* 1996;271:10429-10432.
25. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature.* 1991;352:803-807.
26. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66:807-815.
27. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature.* 1992;357:692-694.
28. Pinkas-Kramarski R, Edelman R, Stein R. Indications for selective coupling to phosphoinositide hydrolysis or to adenylylate cyclase inhibition by endogenous muscarinic receptor subtypes M3 and M4 but not by M2 in tumor cell lines. *Neurosci Lett.* 1990;108:335-340.
29. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:543-548.