

## Effect of TGF- $\beta$ 1 on Osteoclast Differentiation

Su Jin Park, Jea Seung Ko and Hyun-Man Kim\*

Department of Oral Histology & Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, 110-749, Korea

(Received December 18, 2005 ; Accepted December 20, 2005)

Although it has been known that TGF- $\beta$ 1 acts as a crucial cofactor in osteoclast differentiation, its mode of action is still unclear. In the present study, we studied the effect of TGF- $\beta$ 1 on the differentiation of osteoclast depending on the developmental stages. Murine bone marrow cells were induced to differentiate into mature osteoclasts in the presence of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF). In the early stage of the differentiation TRAP(-) mononuclear precursor cells were obtained from nonadherent M-CSF dependent bone marrow cells, which further differentiated into mature osteoclasts. TGF- $\beta$ 1 stimulated osteoclast differentiation, which was stronger when cells were stimulated by TGF- $\beta$ 1 in the early stage than the later differentiation. TGF- $\beta$ 1 increased the expression of RANK and synergistically stimulated RANKL-induced activation of NF- $\kappa$ B MAP kinase in TRAP(-) mononuclear precursor cells. These results suggest that activation of osteoclast differentiation by TGF- $\beta$ 1 may be ascribed to the both increased expression and activation of RANK in the osteoclast differentiation, especially in the early stage of differentiation.

**Keywords:** osteoclast, TGF- $\beta$ , differentiation, bone.

### 서 론

다른 조직보다도 많은 양이 뼈 기질에 함유된(Hauschka, *et al.*, 1986; Seyedin *et al.* 1986; Sandberg *et al.*, 1988; Massaque 1990; Pelton *et al.*, 1991) TGF- $\beta$ 는 뼈 대사를 조절하는 중요한 사이토카인으로서, 뼈 교체

(bone turnover)를 증가시키는 것으로 알려져있다(Robey *et al.* 1987; Dallas *et al.*, 2002; Karsdal *et al.*, 2001; Bonewald and Mundy, 1990; Karsdalet *et al.*, 2001). 생쥐의 두개부위 피하조직내로 유전자 재조합 TGF- $\beta$ 를 국소적으로 주입하면 뼈흡수와 형성이 증가되며(Marcelli, *et al.*, 1990), TGF- $\beta$ 2를 과발현한 유전자 전이 생쥐에서 뼈 교체(bone turnover)의 증가와 관련된 심각한 뼈손실이 초래되었다(Erlebacher and Derynck, 1996). 또한 dominant negative non-functional type II TGF- $\beta$  수용체를 발현하는 유전자 전이 생쥐는 파골세포의 수와 활성이 현저하게 감소되고 뼈의 체적이 증가 하였다고 보고되었다(Filvaroff, 1994). 이러한 여러 보고들은 TGF- $\beta$ 가 파골세포분화나 활성에 중요한 영향을 미치는 것을 시사하는 것으로서 파골세포 분화에는 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)에 의한 receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) 활성화가 필수적이지만 다른 보조 인자가 필요하다는 보고와 일치한다(Fox *et al.*, 2000; Toshio *et al.* 2000; Quinn *et al.*, 2001).

TGF- $\beta$ 가 파골세포 분화에 미치는 영향에 대해서는 상반된 보고들이 있다. TGF- $\beta$ 가 성숙한 파골세포의 자멸(apoptosis)을 유도하거나(Hughes *et al.*, 1996), 골수기 질세포나 뼈모세포계 세포들의 osteoprotegerin (OPG) 생성을 촉진하여 파골세포 분화를 억제한다는 보고가 있는 반면에(Murakami *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1998), 파골세포와 기질세포 및 뼈모세포를 공동 배양한 시스템을 사용한 다른 보고에서는 TGF- $\beta$ 가 파골세포 분화를 촉진하였다고 보고하였다(Fuller *et al.*, 2000).

이에 본 연구에서는 뼈모세포나 골수기질세포 없이 RANKL과 macrophage colony stimulating factor(M-CSF)으로 파골세포를 분화시키는 시스템을 사용하여 TGF- $\beta$ 1이 미치는 영향을 분화 단계별로 조사하고 TGF- $\beta$ 1이 파골세포분화에 관련된 다양한 분자의 발현 혹은 활성화

\*Corresponding author: Hyun-Man Kim, Department of Oral Histology & Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, 110-749, Korea. Tel.: +82-2-740-8670; Fax.: +82-2-763-3613; E-mail: hyunmkim@snu.ac.kr

에 미치는 영향을 연구하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 골수단핵세포의 수집 및 배양

생후 5주된 정상 음성 생쥐(ICR)를 경추탈뼈법으로 희생시키고 경뼈 및 장뼈를 무균적으로 적출하여 3% penicillin-streptomycin (FBS, Gibco, U.S.A.)을 포함한 Hank용액에서 2회 수세한 후 연조직을 제거하고 뼈단부를 절제하였다. 22 gauge 주사침을 이용하여 뼈편의 한쪽 끝에서 다른쪽으로 효소용액(0.1% collagenase type II, 0.05% trypsin, 4 mM ethylene diamine tetraacetic acid [EDTA]; Hank용액)을 관류시킨 후 20분간 소화시켰다. 수집된 골수세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)과 1% penicillin-streptomycin이 함유된  $\alpha$ -MEM (FBS, Gibco, U.S.A.)에 수세하고, 적혈구를 용해시킨 후 이를 cell strainer (40  $\mu$ m Nylon, Falcon, U.S.A.)에 여과시켜 원심분리하였다. 분리한 골수세포를  $1.2 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 1 배양접시(100 mm culture dish)에 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된  $\alpha$ -MEM에 5 ng/ml rhM-CSF (PeproTech, U.S.A.)가 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도를 유지하는 배양기에서 24시간 배양한 후 비부착 세포(골수단핵세포)를 수집하여 다음 실험에 사용하였다.

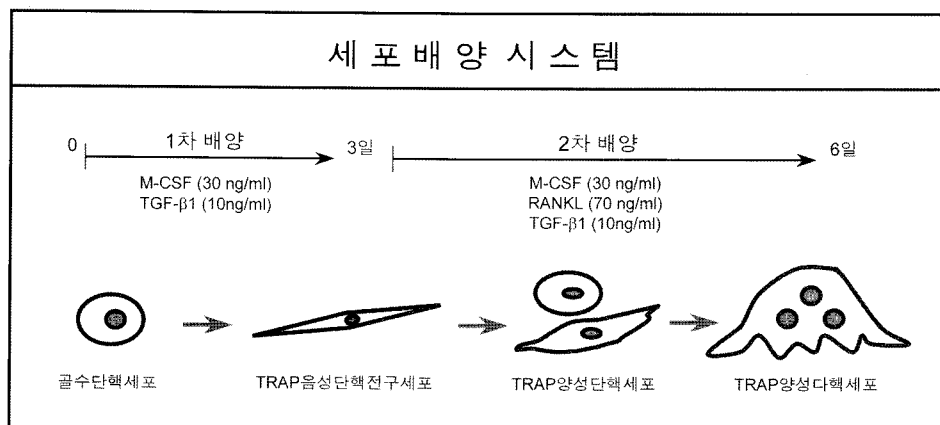
골수단핵세포를 96-well 배양접시(Falcon, U.S.A.)에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하고 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된  $\alpha$ -MEM에 30 ng/ml rhM-CSF과 함께 rhTGF- $\beta$ 1 (PeproTech, U.S.A.)을 처리 또는 무처리하여 3일간 일차 배양하였다. 이후 30 ng/ml rhM-CSF, 70 ng/ml rhRANKL이 함유된 신선한 배양액에 10 ng/ml rhTGF- $\beta$ 1을 처리 또는 무처리하여 교체한 후 매 2일마다 동일한 조성을 갖는 배양액으로 교체해 주면서 5일간 이차 배양하였다.

### p38 MAP kinase 억제제의 첨가 배양

수집한 골수단핵세포를 30 ng/ml rhM-CSF과 함께 10 ng/ml rhTGF- $\beta$ 1을 처리 또는 무처리하여 3일간 일차 배양한 후 2차 배양시 30 ng/ml rhM-CSF, 70 ng/ml rhRANKL이 함유된 배양액에 p38 MAP kinase의 억제제로 알려진 SB203580 (CalBiochem, U.S.A.)을 0, 1, 10  $\mu$ M의 농도로 첨가하여 매 2일마다 동일한 조성을 갖는 배양액으로 교체해 주면서 5일간 이차 배양하였다.

### 역전사 중합반응 분석

골수단핵세포에서 TRAP음성단핵전구세포로의 파골세포의 분화초기에 미치는 TGF- $\beta$ 1의 영향을 알아보기 위하여 RANK, TRAF6에 대한 유전자 발현의 차이를 역전사 중합반응(RT-PCR)방법으로 조사하였다. 수집된 골수단핵세포를 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된  $\alpha$ -MEM에 30 ng/ml rhM-CSF과 함께 rhTGF- $\beta$ 1 (PeproTech, U.S.A.)을 처리 또는 무처리하여 3일간 일차 배양하였다. 배양된 세포로부터 총 RNA를 easy-BLUE RNA extraction kit (INTRON, U.S.A.)를 사용하여 추출하였다. 역전사를 위해 총 RNA 3-5  $\mu$ g과 Oligo (dT) primer 0.5  $\mu$ g을 혼합하여 70°C에서 10분간 반응시키고 얼음 위에서 5분간 냉각시킨 후 40 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>와 200 unit 역전사 효소(Superscript II reverse transcriptase (Gibco, U.S.A.))를 첨가하여 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켜 상보적인 DNA사본 (complementary DNA)을 합성하였다. 합성된 cDNA에 0.5 unit RNase H를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA를 제거하였다. GAPDH 유전자는 대조군과 상대적인 비교 분석을 위하여 참고 유전자로 사용하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 각 유전자에 특이적인 primer(Table 1)와 함께 1 $\times$  PCR reaction buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, Taq polymerase (Gibco, U.S.A.)



**Table 1.** Primer Sequences Used in RT-PCR

	forward	reverse
Murine RANK	5'-acagatggctacacaggcagtg-3'	5'-gaggtctggctgacatacacca-3'
Murine TRAF6	5'-gcccaggtgttcataatgt-3'	5'-gtccatgacctcttctgtgtt-3'
Murine TGF- $\beta$ 1	5'-aggagacggaatacagggct-3'	5'-tctctgtggagctgaagcaa-3'
Murine GAPDH	5'-aacttggcattgtggaagg-3'	5'-acacattggggtaggaaca-3'

5 unit을 혼합하여 PCR을 진행하였다. PCR조건은 95°C에서 5분간 초기 변성시킨 다음, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간의 반응을 30-35회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 유전자는 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 EtBr (Ethidium Bromide)로 염색한 후 UV하에서 관찰하였다.

### Western Blot 분석

TRAP음성단핵전구세포 형성시, RANK와 TAK1의 단백질수준의 발현양상에 미치는 TGF- $\beta$ 1의 효과를 알아보기 위하여 western blot을 시행하였다. 수집된 골수단핵세포를 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 함유된  $\alpha$ -MEM에 30 ng/ml rhM-CSF과 함께 10 ng/ml rhTGF- $\beta$ 1 (PeproTech, U.S.A.)를 처리 또는 무처리하여 3일간 일차 배양한 후 세포를 SDS Sample Buffer(62.5 mM Tris-HCl(pH 6.8), 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT)에서 lysis시켰다. 4°C에서 14000 rpm으로 15분동안 원심분리한 후 supernatant를 모아서 BCA kit를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 50  $\mu$ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 전기영동하고 PVDF membrane에 옮겨 RANK (R&D, U.S.A.), TAK1 (Upstate, U.S.A.)과  $\beta$ -actin (Sigma, U.S.A.)에 대한 일차 항체와 HRP가 표지된 이차 항체, LumiGLO chemiluminescent reagent를 차례로 반응시켜 western blot을 시행하였다. 이후 전산화 영상장치인 Las plus (Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 산물을 확인하였다.

또한 TGF- $\beta$ 1 및 RANKL에 의해 유도되는 신호전달 경로를 관찰하기 위하여, 형성된 TRAP음성단핵 전구세포를 serum-free media에서 4시간동안 starvation하고 1  $\times$  PBS로 3회 세척한 다음 rhRANKL (100 ng/ml), TGF- $\beta$ 1이 각각 포함된 serum-free media에서 0, 5, 15분 동안 각각 배양하고 다시 1  $\times$  PBS로 2회 세척한 다음, 세포를 lysis시켜 위와 동일한 방법으로 western blot을 시행하였다. 일차 항체로는 p38 MAP kinase, phospho-p38 MAP kinase, phospho-ERK1/2, phospho-JNK, I $\kappa$ B- $\alpha$ , phospho-NF- $\kappa$ B (Cell Signaling, U.S.A.), phospho-smad 2/3 (Santa Cruz, U.S.A.)와  $\beta$ -actin (Sigma, U.S.A.)을 사용하였다.

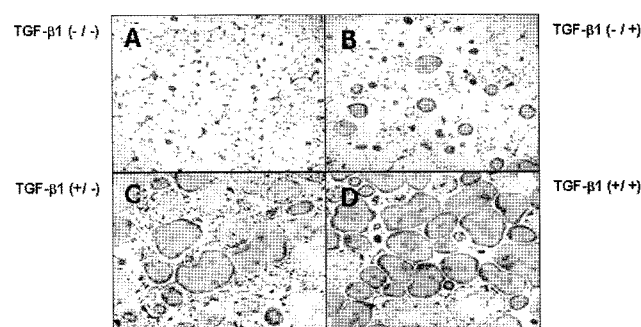
### TRAP양성세포의 검색

배양이 완료된 후 배양된 세포에 대하여 naphthol AS-BI phosphate-Fast Garnet GBC-tartrate 용액(TRACP kit, Sigma Co.)으로 TRAP염색을 실행하였다. 본 실험에서는 3개 이상의 핵을 가진 TRAP양성다핵세포(MNC)를 성숙한 파골세포로 간주하여 그 수를 산정하였다. 모든 정량적 분석은 평균 $\pm$ 표준편차를 구하였고, 각 군간의 차이는 independent Student's t-test에 의하여 p<0.05 수준에서 통계적인 유의성을 평가하였다.

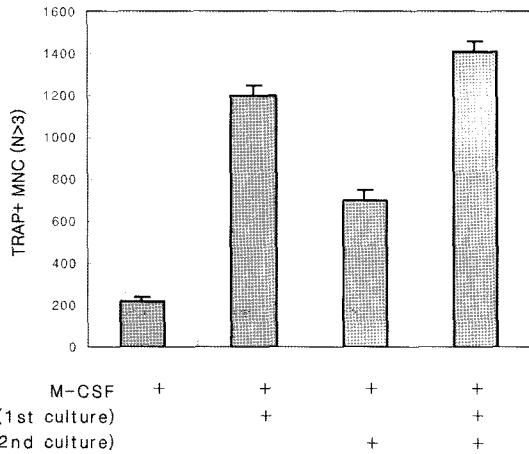
### 결 과

TGF- $\beta$ 1이 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 M-CSF와 RANKL로 파골세포 분화를 유도할 때 TGF- $\beta$ 1을 처리한 후 형성된 TRAP양성다핵세포의 수를 조사하였다. 그 결과 TGF- $\beta$ 1은 파골세포 분화를 현저하게 증가시켰다. TGF- $\beta$ 1을 1, 2차 배양동안 모두 처리한 군이 가장 많았는데, 특이한 것은 1차 배양동안 TGF- $\beta$ 1을 처리한 군이 2차 배양동안 처리한 군에 비해 분화된 파골세포의 수가 약 1.5배 이상 증가한 점이었다 (Fig. 1, 2).

TRAP음성단핵전구세포 형성시 RANKL의 신호전달 경로를 매개하는 수용체인 RANK의 발현에 TGF- $\beta$ 1이 관여하는지 알아보기 위해 유전자 및 단백질 발현을 조사하였다. 골수단핵세포를 M-CSF와 함께 TGF- $\beta$ 1을 처리



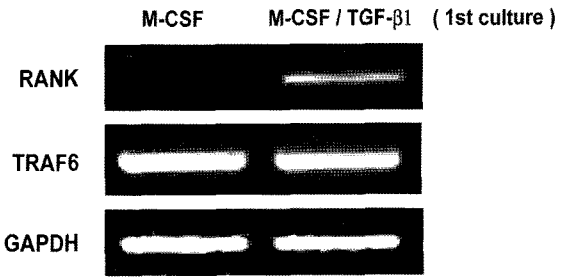
**Fig. 1.** Effects of TGF- $\beta$ 1 on the osteoclast formation. The first culture was incubated in the presence of M-CSF (30 ng/ml) without TGF- $\beta$ 1 (A, B) or with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) (C, D). The second culture was incubated in the presence of M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (70 ng/ml) without TGF- $\beta$ 1 (A, C) or with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) (B, D). (TRAP stain,  $\times$  100)



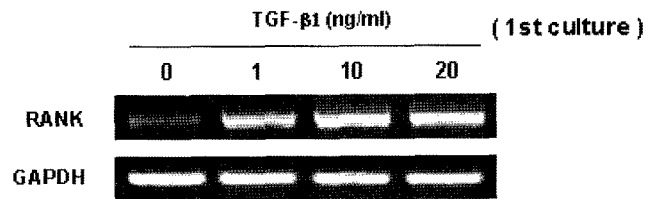
**Fig. 2.** TGF-β1 acts as a costimulator for osteoclast formation. During the first culture bone marrow cells were incubated with M-CSF (30 ng/ml) and/or TGF-β1 (10 ng/ml). Then cells were treated with M-CSF (30 ng/ml), RANKL (70 ng/ml) and/or TGF-β1 (10 ng/ml) in the second culture. Cells were counted after staining for tartrate-resistant acid phosphatase. TRAP(+) multinucleated cells (MNC) containing three or more nuclei were counted in each well. Data are shown as the mean ± S.D. of triplicate culture.

또는 무처리하여 3일간 일차 배양한 후 RT-PCR을 통해 RANK 유전자 발현율을 조사하였다. 또한 RANK와 복합체를 이루어 RANKL에 의해 유도되는 신호전달경로에 중요하게 관여하는 하위신호전달매개물로 알려진 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)의 유전자 발현율을 조사하였다. 그 결과 TRAP음성단핵세포 형성시, TGF-β1은 RANK의 발현을 현저하게 촉진시켰으나 TRAF6의 발현에는 관여하지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 TGF-β1의 농도(0, 1, 10, 20 ng/ml)에 의존적으로 RANK의 발현이 증가하는 것을 통해 재확인할 수 있었다 (Fig. 4). 그리고 TGF-β1에 의해 유도된 RANK mRNA가 실제로 단백질 발현으로 진행될 수 있는지 Western Blot을 통해 분석한 결과, TGF-β1이 처리된 군에서 RANK 단백질 발현이 증가하였다 (Fig. 6). 또한 TRAF6, TAK binding protein 2 (TAB2)와 함께 RANK와 복합체를 형성하여 RANKL에 의해 유도되는 신호전달경로를 매개하는 역할을 하는 TGF-β-activated kinase 1 (TAK1)의 (Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003) 발현이 TRAP음성단핵전구세포 형성시 TGF-β1에 의해 유도증가되었다 (Fig. 5). 한편 M-CSF는 농도 의존적으로 endogenous TGF-β1의 발현을 증가시켰다(Fig. 6).

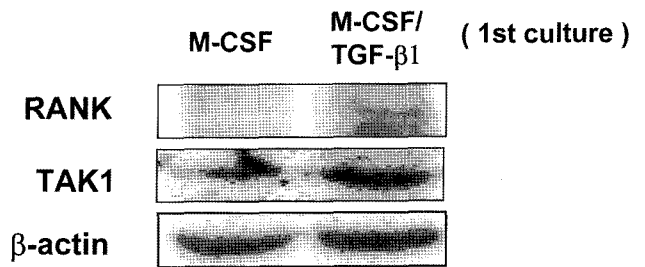
TGF-β1로 처리된 TRAP음성단핵전구세포에서 RANKL에 의해 유도되는 신호전달경로에 어떠한 변화가 나타나는지 알아보기 위하여 M-CSF와 함께 TGF-β1을 처리하여 1차 배양한 세포에 RANKL을 0, 5, 15분동안 자극하고 파골세포 분화에 중요한 분자인 JNK, ERK, p38 MAP kinase, NF-κB의 활성화물(Tanaka *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2000; Mizukami *et al.*,



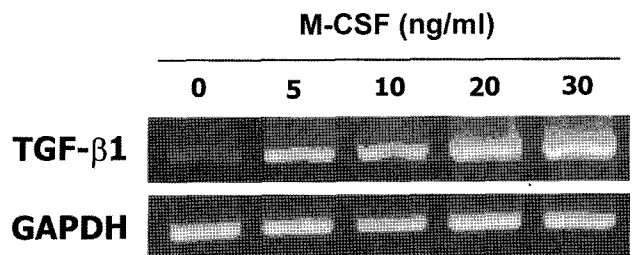
**Fig. 3.** RT-PCR analysis of the expression of RANK and TRAF6 mRNA levels in TRAP(-) mononuclear precursor cells generated. Bone marrow cells were treated with M-CSF (30 ng/ml) in the presence or absence of TGF-β1 (10 ng/ml).



**Fig. 4.** Dose-dependent effect of TGF-β1 on RANK mRNA levels in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were treated with various concentration of TGF-β1 (0, 1, 10 and 20 ng/ml) in the presence of M-CSF (30 ng/ml).



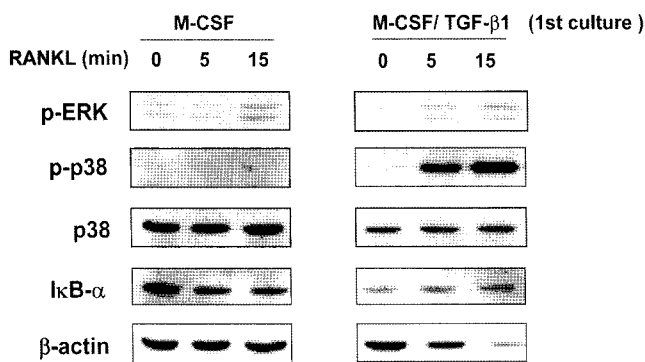
**Fig. 5.** Western blot analysis of the expression of RANK and TAK1 protein levels in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were incubated for the first culture with M-CSF (30 ng/ml) and/or TGF-β1 (10 ng/ml).



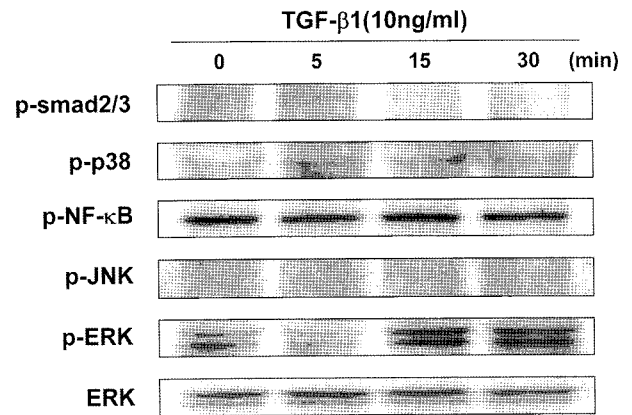
**Fig. 6.** RT-PCR analysis of the expression of TGF-β1 mRNA levels in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were treated with various concentration of M-CSF (5, 10, 20 and 30 ng/ml).

2002) 연구하였다. 그 결과 TGF- $\beta$ 1처리에 의한 ERK와 JNK의 활성화에는 유의한 차이가 없었고, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해율을 비교한 NF- $\kappa$ B의 활성화도 차이가 미미하였다. 그러나 흥미롭게도 RANKL에 의해 유도되는 p38 MAP kinase의 활성화는 TGF- $\beta$ 1 처리군에서 뚜렷이 증가되었다 (Fig. 7). 이 결과는 TGF- $\beta$ 1이 파골세포분화를 촉진하는 이유가 TGF- $\beta$ 1 전처리가 RANKL에 의한 p38 활성화를 촉진시키는데 있을 가능성이 있음을 시사하는 결과이다.

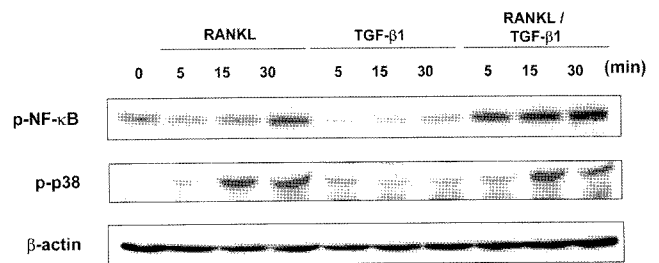
다음은 TRAP음성단핵세포에서 TGF- $\beta$ 1이 어떠한 신호전달경로를 통해 세포를 활성화시키는지 알아보기 위하여 M-CSF만으로 1차 배양된 TRAP음성단핵전구세포를 TGF- $\beta$ 1으로 0, 5, 15, 30분간 자극하였다. TGF- $\beta$ 1에 의해 유도되는 대표적인 신호전달경로로 알려진 smad2/3 및 p38, ERK, JNK, NF- $\kappa$ B에 대한 활성화를(Zhang *et al.*, 2004; Javelaud *et al.*, 2004; Kato, 2003) 관찰하였다. 그 결과 TGF- $\beta$ 1은 ERK를 활성화시켰으나 smad2/3 및 p38, JNK, NF- $\kappa$ B의 신호전달경로 활성화에는 직접적으로 관여하지 않았다(Fig. 8). 그러나 TGF- $\beta$ 1은 단독으로 smad2/3 및 p38, ERK, JNK, NF- $\kappa$ B와 같은 파골세포 분화에 중요한 신호전달경로를 활성화시키지는 못하였지만 RANKL의 NF- $\kappa$ B 활성화를 현저하게 증가시켰다. TRAP음성단핵세포에 각각 RANKL, TGF- $\beta$ 1 또는 RANKL/TGF- $\beta$ 1으로 0, 5, 15, 30분간 자극하여 NF- $\kappa$ B와 p38의 활성화를 조사한 결과, TGF- $\beta$ 1은 RANKL에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B 활성화를 현저하게 증가시키는 시너지 효과를 나타냈다. 그러나 TGF- $\beta$ 1은 RANKL에 의해 유도되는 p38의 활성화에는 기여하지 못했다(Fig. 9).



**Fig. 7.** Intracellular signal activation by RANKL in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were incubated with M-CSF (30 ng/ml) and/or TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). At the end of the culture period, cells were stimulated with RANKL (200 ng/ml) for 0, 5, and 15 min. Cell lysates were prepared and immunoblot analysis was performed with antibodies reactive with phosphorylated ERK (p-ERK), phosphorylated p38 (p-p38), p38, I $\kappa$ B $\alpha$  or  $\beta$ -actin.



**Fig. 8.** Effect of TGF- $\beta$ 1 on intracellular signal activation in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were incubated with M-CSF (30 ng/ml) alone. At the end of the culture period, cells were stimulated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) for 0, 5, 15 or 30 min. Cell lysates were prepared and immunoblot analysis was performed with antibodies reactive with phosphorylated smad2/3 (p-smad2/3), phosphorylated p38 (p-p38), phosphorylated NF- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B), phosphorylated ERK (p-ERK) and ERK.



**Fig. 9.** Intracellular signal activation by RANKL alone or with TGF- $\beta$ 1 in TRAP(-) mononuclear precursor cells. Bone marrow cells were incubated for the first culture with M-CSF (30 ng/ml) alone. At the end of the culture period, cells were stimulated with RANKL (200 ng/ml) and/or TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) for 0, 5, 15 and 30 min. Cell lysates were prepared and immunoblot analysis was performed with antibodies reactive with phosphorylated NF- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B), phosphorylated p38 (p-p38) and  $\beta$ -actin.

## 고찰

골수단핵세포로부터 TRAP음성단핵전구세포로의 1차 배양과 TRAP음성단핵세포로부터 TRAP양성 다핵세포로의 2차 배양에 TGF- $\beta$ 1을 각각 처리 또는 무처리하여 파골세포 형성을 관찰한 결과 1, 2차 배양에 TGF- $\beta$ 1를 모두 처리한 군에서 더 많은 수의 파골세포가 형성되었지만 1, 2차 배양동안 각각 처리한 군들도 TGF- $\beta$ 1을 처리하지않은 대조군에 비해 파골세포 분화가 현저하게 증진되었다. 특히 1차 배양동안 TGF- $\beta$ 1을 처리한 군은 2차 배양동안 처리한 군에 비해 파골세포 형성이 유의하게 증가하였다. 이는 TGF- $\beta$ 1의 파골세포의 분화 증진 효과가 분화초기에 더 강력하게 작용함을 의미한다.

TGF- $\beta$ 1은 TRAP음성단핵전구세포형성 단계에서 RANKL

의 신호전달 수용체인 RANK의 mRNA 및 단백질발현을 현저하게 증가시켰다. 이는 M-CSF에 의해 발현이 유도된다고 알려져 있는 RANK의 발현을 TGF- $\beta$ 1가 촉진하는 것을 가리키는 것으로서, 이러한 현상은 파골세포 전구세포주인 RAW세포주에서도 보고된 바 있다(Yan *et al.*, 2001). 본 연구는 세포주가 아닌 파골세포의 기원이 되는 실제 골수세포에서 이를 확인하였다. 한편 TRAP음성단핵전구세포 형성시 M-CSF 농도에 의존적으로 TGF- $\beta$ 1 mRNA의 발현이 증가하였는데, 이는 M-CSF에 의한 RANK 발현에 endogenous TGF- $\beta$ 1가 관여할 가능성을 시사한다.

TGF- $\beta$ 1이 전 처리된 TRAP음성전구세포에서 RANKL에 의한 p38 MAP kinase의 활성화가 뚜렷이 증가하였는데, 이 결과는 RANKL 및 TNF- $\alpha$ 에 의해 분화된 파골세포 분화시 p38 MAP kinase의 활성화가 중추적인 신호전달경로로 작용한다는 보고와 일치한다(Karsdal *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.* 2000). 한편 TRAP음성단핵전구세포로가 TRAP양성단핵세포로 분화하는 시기에 p38 MAP kinase의 억제제인 SB203580처리가 파골세포 분화를 강하게 억제하는 것은 p38 MAP kinase 신호전달경로 활성화가 분화후기에 특히 결정적인 역할을 하는 것을 시사하는 결과였다.

TAK1은 TRAF6, TAB2와 함께 RANK와 복합체를 형성하여 RANKL에 의해 매개되는 신호 전달경로에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Mizukami *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). 본 연구에서도 TGF- $\beta$ 1에 의해 형성된 TRAP음성단핵전구세포에서 TAK1의 단백질 발현이 촉진되어 있음을 확인하였는데, 앞으로 파골세포 분화에 TAK1의 역할을 위한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

TGF- $\beta$ 1은 여러 신호전달경로를 통해 많은 종류의 세포들에게 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데, 본 연구의 파골세포 분화에 있어서는 TRAP음성단핵전구세포에서 TGF- $\beta$ 1은 ERK를 강하게 활성화 시켰지만, smad2/3, p38, JNK, NF- $\kappa$ B의 활성화에는 유의성 있는 변화를 일으키지않았다. 이 결과는 TGF- $\beta$ 1와 관련하여 파골세포의 활성화에 MAPK의 역할을 연구할 필요성을 제기한다.

이상의 결과를 종합하면 TGF- $\beta$ 1은 파골세포분화를 촉진하였는데, 특히 골수단핵세포가 TRAP음성단핵전구세포로 분화하는 시기에 더욱 중요하게 작용하였는데, 이 시기에 TGF- $\beta$ 1은 골수단핵세포의 RANK발현이나 활성화를 촉진하므로써 그 효과를 발휘하는 것으로 여겨진다.

의하여 이루어진 것임. (과제고유번호: 01-PJ5-PG3-20507-0016)

## 참고문헌

- Bonewald, L. F. and Mundy, G. R.: Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin. Orthop.* **250**: 261-276, 1990.
- Dallas, S. L., Rosser, J. L., Mundy, G. R., and Bonewald, L. F.: Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *Biol. Chem.* **277**: 21352-21360, 2002.
- Erlebacher, A. and Derynck, R.: Increased expression of TGF- $\beta$ 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotypes. *J. Cell Biol.* **132**:195-210, 1996.
- Filvaroff, E. H., Ebner, R., and Derynck, R.: Inhibition of myogenic differentiation in myoblasts expressing a truncated type II TGF- $\beta$  receptor. *Development.* **120**: 1085-1095, 1994.
- Fox, S. W., Fuller, K., Bayley, K.E., Lean, J. K., and Chambers, T. J.: TGF-beta 1 and IFN-gamma direct macrophage activation by TNF-alpha to osteoclastic or cytotoxic phenotype. *J. Immunol.* **165**:4957-4963, 2000.
- Fuller, K. Lean, J. M., Bayley, K. E., Wani, M. R., and Chambers, T. J.: A role for TGF- $\beta$ 1 in osteoclast differentiation and survival. *J. Cell Sci.* **113**:245-253, 2000.
- Hauschka, P. V., Mavrakas, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., and Klagsbrun, M.: Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* **261**:12665-12674, 1986.
- Hughes, D. E., Dai, A., Tiffée, J. C., Li, H. H., Mundy, G. R., and Boyce, B. F.: Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat. Med.* **2**:1132-1136, 1996.
- Javelaud, D. and Mauviel, A.: Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology. *Pathol Biol (Paris).* **52**:50-54, 2004.
- Karsdal, M. A., Fjording, M. S., Foged, N. T., Delaisse, J. M., and Lochter, A.: Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 39350-39358, 2001.
- Karsdal, M. A., Hjorth, P., Henriksen, K., Kirkegaard, T., Nielsen, K. L., Lou, H., Delaisse, J. M and Foged, N. T.: Transforming growth factor- $\beta$  controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem.* **277**:44975-44987, 2003.
- Karsdal, M. A., Larsen, L., Engsig, M. T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaisse, J. M., and Foged, N. T.: Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**:49343-49349, 2001.
- Kato, M.: Transcriptional regulation by the transforming

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원에

- growth factor-beta signaling. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **48**:2247-2253, 2003.
- Kim, H. H., Chung, W. J., Lee, S. W., Chung, P. J., You, J. W., Kwon, H. J., Tanaka, S., and Lee, Z. H.: Association of sustained ERK activity with integrin beta3 induction during receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)-directed osteoclast differentiation. *Exp Cell Res*. **289**:368-77, 2003.
- Kim, H. H., Lee, D.E., Shin, J. N., Lee, Y. S., Jeon, Y. M., Chung, C. H., Ni, J., Kwon, B. S., and Lee, Z. H.: Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett*. **443**:297-302, 1999.
- Lee, S. W., Han, S. I., Kim, H. H., and Lee, Z. H.: TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J Biochem Mol Biol*. **35**:371-376, 2002.
- Li, X., Udagawa, N., Itoh, K., Suda, K., Murase, Y., Nishihara, T., Suda, T and Takahashi, N.: p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology*. **143**:3105-3113, 2002.
- Marcelli, C., Yates, A. J., and Mundy, G. R.: In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. *J. Bone Miner. Res*. **5**:1087-1096, 1990.
- Massague, J.: The transforming growth factor-beta family. *Ann. Rev. Cell. Biol*. **6**:597-609, 1990.
- Matsumoto, M., Sudo, T., Maruyama, M., Osada, H and Tsujimoto, M.: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is crucial in osteoclastogenesis induced by tumor necrosis factor. *FEBS Lett*. **486**:23-28, 2000.
- Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H and Tsujimoto, M.: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. **275**:31155-31161, 2000.
- Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., and Tsujimoto, M.: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. **275**:31155-61, 2000.
- Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Sakurai, N.: Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol*. **22**:992-1000, 2002.
- Murakami, T., Yamamoto, M., Ono, K., Nishikawa, M., Nagata, N., Mytoyoshi, K., and Akatsu, T.: Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stroma cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **252**:747-752, 1998.
- Pelton, R. W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H. L., and Gold, L. I.: Immunohistochemical localization of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 in the mouse embryo : expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol*. **115**:1091-1105, 1991.
- Quinn, J. M., Itoh, K., Udagawa, N., Hausler, K., Yasuda, H., Shima, N., Mizuno, A., Higashio, K., Takahashi, N., Suda, T., Martin, T. J., and Gillespie, M. T.: Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J. Bone Miner. Res*. **16**:1787-1794, 2001.
- Robey, P. G., Young, M. F., Flanders, K. C., Roche, N. S., Kondaiah, P., Reddi, A., Termine, J. D., Sporn, M. B., and Roberts, A. N.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) in vitro. *J. Cell Biol*. **105**:457-463, 1987.
- Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K., and Vuorio, E. Enhanced expression of TGF- $\beta$  and c-fos mRNA in the growth plates of developing human long bones. *Development*. **102**:1461-1470, 1988.
- Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., Mepheron, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. F., and Piez, K. A.: Cartilage-inducing factor-A : apparent identity to transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem*. **261**:5693-5695, 1986.
- Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K., and Yamada, Y.: Transforming growth factor $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stroma cells. *J. Biol. Chem*. **273**:27091-27096, 1998.
- Tanaka, S., Nakamura, I., Inoue, J., Oda, H., and Nakamura, K.: Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Metab*. **21**:123-33, 2003.
- Toshio, K., Takaki, N., Mari, N., Aichi, O., Hirori, K., Takuya, S., Hiroshi, M., Masayoshi, K., and Yoshiyuki, H.: Endogenous production of TGF- $\beta$  is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand and Macrophage-Colony stimulating Factor. *J. Immunol*. **165**:4254--4263, 2000.
- Yan, T., Riggs, B. L., Boyle, W. J. and Khosla, S.: Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem*. **83**:320-325, 2001.
- Zhang, L., Duan, C. J., Binkley, C., Li, G., Uhler, M. D., Logsdon, C. D., and Simeone, D. M.: A transforming growth factor beta-induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. *Mol Cell Biol*. **24**:2169-2180, 2004.