

L-형 칼슘 이온통로에 의한 파골세포 분화의 조절

노아롱새미 · 임미정[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received July 5, 2010; Revised October 13, 2010; Accepted October 18, 2010)

The Regulation of Osteoclastogenesis by L-Type Channel Agonist

A Long Saemi Noh and Mijung Yim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — We investigated the role of L-type Ca^{2+} channel in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast formation. BayK 8644, a L-type Ca^{2+} channel agonist, was shown to increase the RANKL-induced osteoclastogenesis and actin ring formation in mouse bone marrow-derived macrophage (BMM) culture system. BayK 8644 stimulated RANKL-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 MAP kinase (MAPK) activation, which leads to increased nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 expression. Taken together, these data indicate that L-type Ca^{2+} channel regulates osteoclast formation possibly through ERK- and p38-mediated NFATc1 expression.

Keywords □ L-type Ca^{2+} channel, osteoclast, NFATc1, ERK, p38

우리나라는 매우 빠른 속도로 고령화가 진행되고 있어, 2000년 고령화 사회 진입 이후 2018년에 고령사회, 그리고 2026년에는 초고령사회로 진입할 것으로 예상되고 있다. 이와 같은 인구 고령화에 따라 삶의 질을 위협하는 다양한 노인성 질환이 급증하고 있으며, 그 중 대표적인 것이 골다공증 등의 골격계 질환이라 할 수 있다.

뼈는 새로운 뼈를 형성하는 조골세포(osteoblast)와 오래된 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)에 의해 평형을 유지한다.^{1,2)} 특히 파골세포는 골대사의 중추적 역할을 하며, 파골세포의 이상 활성화는 골다공증뿐 아니라 골절의 위험을 증가시키는 것으로 나타나, 골다공증 치료제의 중요한 타겟 세포로 작용하고 있다. 파골세포는 조혈모세포로부터 분화하며, 중요한 분화인자로 M-CSF(Macrophage Colony-Stimulating Factor, or CSF-1)와 RANKL(Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB Ligand, OPGL, ODF, or TRANCE)을 들 수 있다. RANKL은 파골전구 세포 표면에 존재하는 RANK 수용체에 결합하며 파골세포의 증식, 분화, 생존을 촉진한다.³⁻⁵⁾

칼슘은 많은 세포에서 세포내 이차 전달자로 작용하며 증식, 활성화, 세포사와 같은 다양한 과정을 조절한다. 휴식기 세포에서 세포내 칼슘 농도는 낮은 농도로 유지되나, 호르몬, 성장인자, 항체와 같은 자극제들은 소포체 또는 세포외로부터 칼슘의 이동을 촉진시켜 세포내 칼슘 농도를 올리게 된다.⁶⁾ 칼슘의 이동에 관여하는 다양한 칼슘 통과성 채널이 세포막에 존재하며 voltage-operated channels(VOCs or voltage-gated Ca^{2+} channel), receptor-operated channels(ROCs), second messenger-operated channels(SMOCs), store-operated channels(SOCs) 등이 알려진 바 있다. 그 중 voltage-gated Ca^{2+} 통로는 중심이 되는 $\alpha 1$ 단위와 보조적인 β , $\alpha 2$, δ , γ 단위로 구성되며 단위의 종류에 따라 L-, T-, N-, P/Q-, R- type Ca^{2+} 통로로 나눌 수 있다.⁷⁾

다양한 외부 자극이 세포내 칼슘 농도를 조절하며 이에 따라 파골세포 분화와 골흡수 기능이 조절됨이 알려져 있다. 예를 들면 RANKL 자극은 초기에 칼슘 oscillation을 통해 파골세포 분화의 핵심전사인자인 Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT)c1의 발현을 유도하며, 분화가 진행됨에 따라 칼슘 oscillation은 사라지고 지속적인 칼슘 농도의 유지로 전환하여 분화를 마무리하게 된다.^{8,9)} 반면 외부의 높은 칼슘 농도에 노출된 파골세포는 골흡수 기능이 억제되며,^{10,11)} 세포내 칼슘 농도의 증가는 산 분비를 억제함으로써 골흡수를 방해한다.¹²⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

칼슘에 의한 신호전달이 주목받게 됨에 따라 최근 파골세포에 있어서 다양한 칼슘 통로의 기능이 보고되고 있으나, 파골세포 분화에 대한 L형 칼슘이온 통로의 역할은 아직 밝혀진 바 없다. 이에 본 연구자는 L형 칼슘이온 통로 항진제를 이용해 파골세포 분화에 관여하는 L형 칼슘이온 통로의 역할을 조사하였기에 보고하는 바이다.

실험방법

마우스 골수세포의 배양

ICR 마우스(6~9주, 수컷)를 경추 탈골한 후 70% 에탄올로 소독하였다. 경골 부분의 피부를 절개하여 부착 근육을 떼어냈다. 경골 원심부를 절단하고 슬개골을 탈골시켜 경골을 적출하였다. 뼈 양끝을 조금 잘라 한 쪽 끝에 25G의 주사바늘을 꽂고 α -MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 원심 분리한 후 α -MEM에 현탁하고 2배의 Gey's solution을 가해 적혈구를 제거했다. 원심 분리한 후 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 재현탁

했다.

파골세포의 분화유도

초기 배양한 골수세포를 M-CSF 10 ng/ml로 하룻밤 배양한 후 부유세포를 M-CSF 30 ng/ml로 3일간 추가 배양했다. 접착 세포를 회수 후 2×10^4 cells/well에 RANKL 50 ng/ml과 M-CSF 30 ng/ml 존재하에서 4일간 배양했다. 배양이 끝난 세포는 10% formalin으로 10분간 고정한 후 ethanol-aceton(1:1)로 1분간 재고정하여 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색하거나 또는 rhodamine-conjugated phalloidin으로 37°C에서 1시간 처리하여 actin-ring을 염색하였다. 현미경하에서 관찰하여 3개 이상의 핵을 가진 TRAP+ 세포를 다핵 파골세포로 판정하거나, 공초점 형광 현미경을 이용해 actin-ring의 생성을 감별하였다.

Western blot 분석

파골전구세포를 시약 처리하여 일정시간 배양 후, lysate buffer로 용해하고 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum

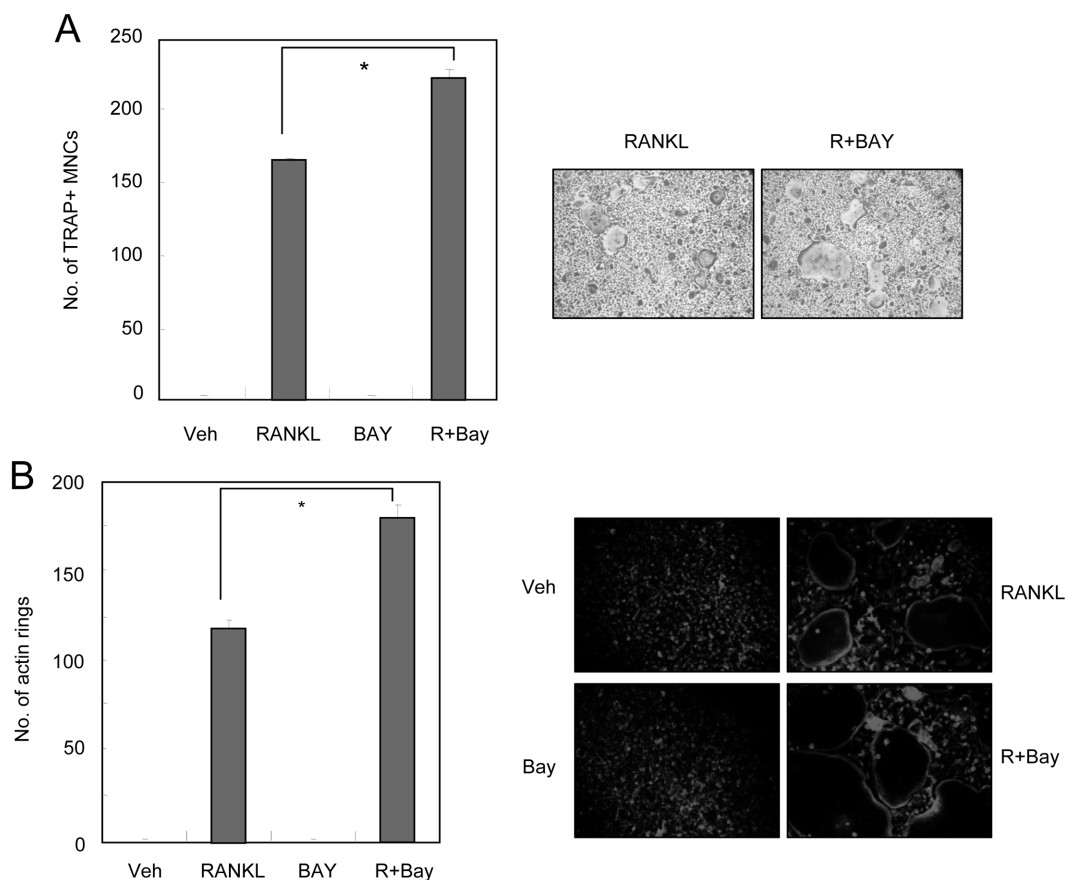


Fig. 1 – Effects of BayK 8644 on osteoclastogenesis and actin ring formation. BMM cells were cultured with 30 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL for 4 days in the absence or presence of 10 μ M BayK 8644. Cells were then fixed and stained for TRAP (A) or actin ring (B) as described in Materials and methods. Values are the mean \pm SD of triplicate cultures in a representative experiment. R: RANKL, *: $p < 0.05$.

albumin)을 표준화하여 protein assay kit(Bio-Rad)를 사용하여 정량하였다. 20 µg의 단백질을 SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하고, 이를 80 v에서 1시간 45분 처리하여 PVDF membrane에 이주시켰다. 이를 5% skim milk가 함유된 PBST 용액으로 blocking하고, 1차 항체로서 anti-NFATc1 (1:1000, Santa cruz), p-ERK(1:1000, Cell signaling), ERK (1:1000, Cell signaling), p-p38(1:1000, Cell signaling), p38 (1:1000, Cell signaling), COX-2(1:2000, R&D systems), c-fos(1:1000, Cell signaling), 또는 β-actin(1:4000, Sigma) 항체와 각각 반응시켰다. PBST로 5회 세정하고 HRP(Horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 ECL Advance (Amersham. CO.)로 발색시켜 분석하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, Student's t-test로 분석하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

파골세포 분화에 대한 L형 칼슘이온 통로의 효과

마우스 골수세포를 M-CSF로 처리하여 3일간 배양하면 Bone Marrow Macrophages(BMM)가 생성되며, 이는 M-CSF와 RANKL 존재하에서 약 4일 후 파골세포로 분화한다. BMM 배양계를 사용해 파골세포 분화에 있어서 L형 칼슘이온 통로의 기능을 조사하였다. BMM 세포에 L형 칼슘이온 통로 항진제인 BayK 8644를 처리하였을 때 TRAP+ 다핵 파골세포의 수가 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 이러한 파골세포 분화 촉진 효과는 BayK 8644를 BMM 배양 초기(day 0~2)에 처리하였을 때 관찰할 수 있었다(미발표 결과). BayK 8644의 처리는 L형 칼슘이온 통로의 활성화를 통해 세포내 칼슘 농도를 증가시키는 것으로 보고된 바 있으며,¹³⁾ 일시적인 세포내 칼슘 농도의 증가는 파골세포 형성에 중요한 신호전달 분자로 작용함이 알려져 있다.⁸⁾ 따라서 BayK 8644의 처리는 BMM 표면의 L형 칼슘이온 통로를 통한 칼슘 유입을 증가시키고 이로 인해 파골세포로의 분화가 촉진된 것으로 추정되었다. 이상의 결과는 L형 칼슘이온 통로가 세포내 칼슘 농도를 통해 파골세포 분화를 조절할 수 있음을 의미한다.

파골세포의 주된 기능은 골흡수이며, 파골세포가 골 표면에 부착하기 위해서는 actin ring의 형성이 필수적이다.¹⁴⁾ RANKL 처리시 파골세포내 actin ring의 형성이 증가되었으며, BayK 8644는 RANKL에 의한 파골세포의 actin ring 형성도 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이는 파골세포 분화 결과와 일치하는 것으로, BayK 8644가 파골세포의 분화에 따른 actin ring 형성도

촉진함을 알 수 있다.

파골세포 분화 촉진에 관여하는 L형 칼슘이온 통로 항진제의 작용 기전

파골세포 분화에 관한 RANKL 자극을 매개하는 다양한 유전자 밝혀진 바 있다. 특히 RANKL의 자극은 파골전구세포에서 Nuclear Factor of Activated T cells(NFAT)c1의 발현을 유도하며, NFATc1은 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자로 알려져 있다.¹⁵⁾ NFATc1은 RANKL 자극에 의한 세포내 칼슘 신호 전달로 초기 유도되며, 그 후 extracellular signal-regulated kinase(ERK), NF-κB, p38, c-fos 등의 활성화가 NFATc1의 자가 증폭을 유발하여 활성이 지속된다.⁸⁾ 이와 별도로 세포내 칼슘 신호는 직접적으로 또는 c-fos를 매개하여 NFATc1의 자가 증폭을 유발하는 것이 알려져 있다.⁸⁾ 본 연구에서 BayK 8644가 RANKL에 의한 파골세포 분화를 촉진함이 밝혀졌으므로 이의 작용기전을 규명하고자 하였다. 먼저 BayK 8644의 처리가 핵심 전사인자인 NFATc1의 발현을 변화시키는지 항 NFATc1 항체를 이용한 western blot 분석법으로 조사하였다. BMM을 RANKL로 24시간 처리하였을 때 기존에 보고된 바와 같이 NFATc1의 발현이 증가하였으며, BayK 8644의 처리는 RANKL에 의한 NFATc1의 발현을 유의성 있게 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는

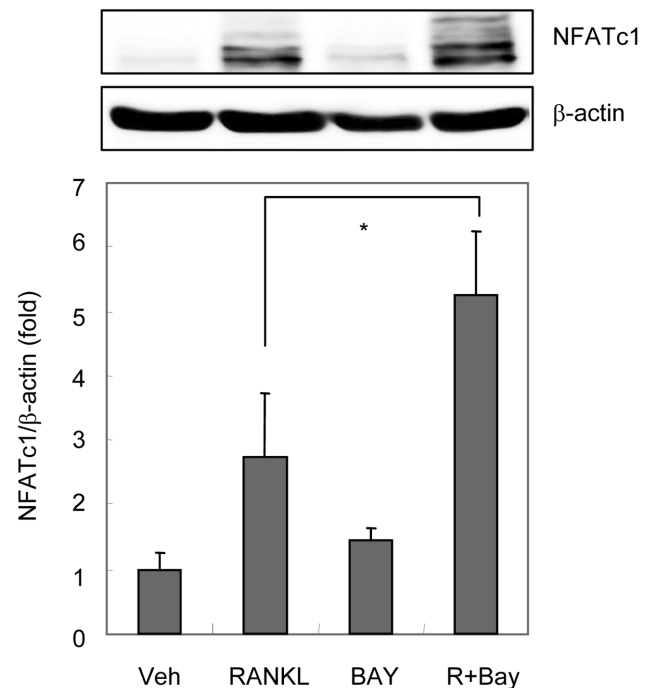


Fig. 2 – Effects of BayK 8644 on the RANKL-induced NFATc1 expression. BMM cells were cultured with 100 ng/ml RANKL for 24 hrs in the absence or presence of 10 µM BayK 8644. The expression of NFATc1 was determined by western blotting assay. Values are the mean±SD of three independent experiment. R: RANKL, *: *p*<0.05.

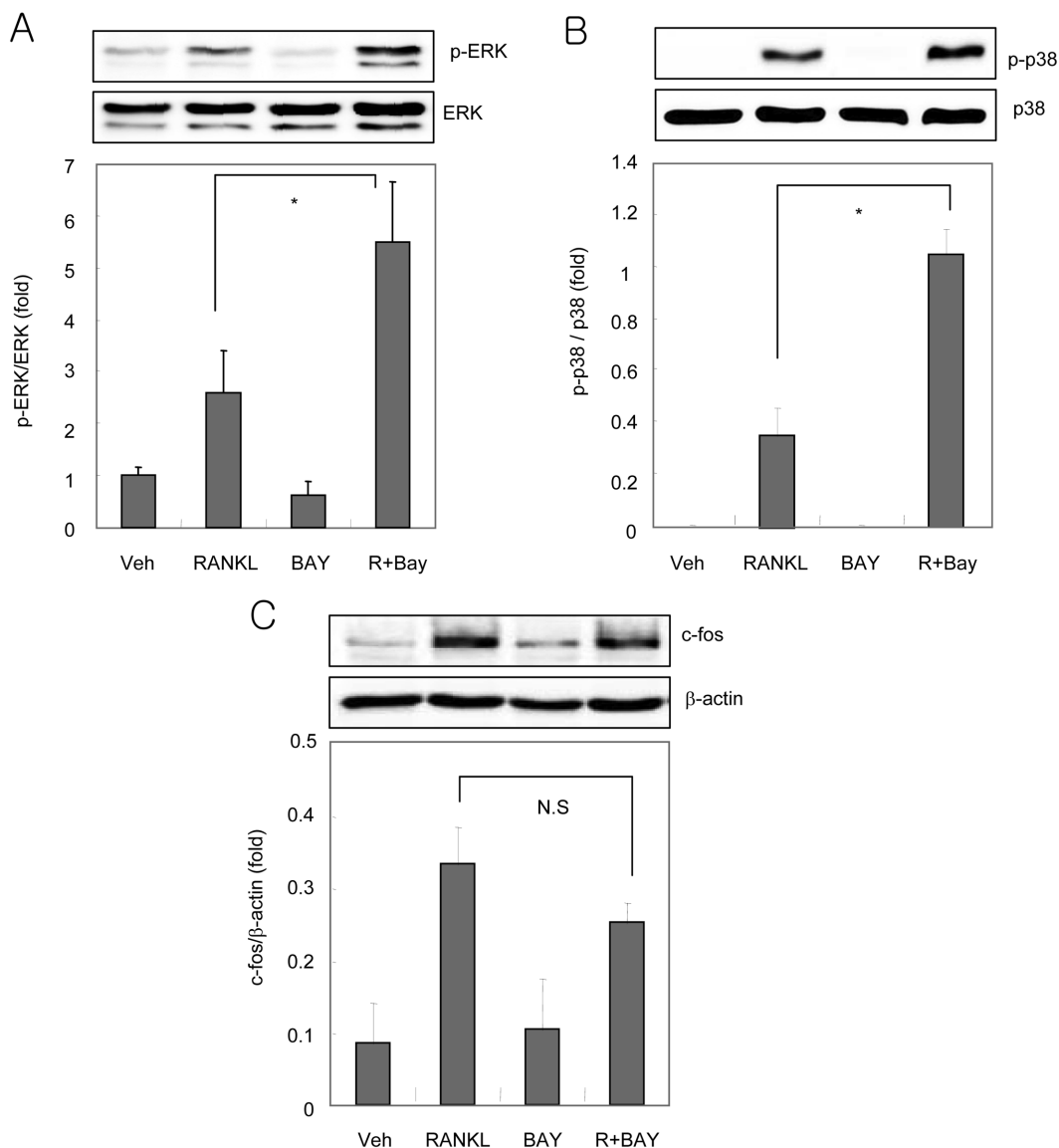


Fig. 3 – Effects of BayK 8644 on the RANKL-induced signaling pathways. BMM cells were cultured with 100 ng/ml RANKL for 15 min (ERK and p38) or 24 hrs (c-fos) in the absence or presence of 10 μ M BayK 8644. The expressions of p-ERK (A), p-p38 (B) and c-fos (C) was determined by western blotting assay. Values are the mean \pm SD of three independent experiment. R: RANKL, N.S.: non significant, *: $p < 0.05$.

BayK 8644가 파골세포의 분화를 촉진하는 것과 일치하는 것으로, BayK 8644는 NFATc1의 발현을 증가시킴으로써 파골세포 분화를 촉진하는 것으로 생각되었다.

BayK 8644의 보다 구체적인 신호전달 경로를 파악하기 위해 다음은 ERK, p38 MAPK, c-fos 경로를 조사하고자 하였다. BayK 8644에 의한 NFATc1의 발현 유도도가 ERK, p38 MAPK, 또는 c-fos 경로를 매개한 것인지 각각의 항체를 이용한 western blot 분석법으로 조사하였다. BMM을 RANKL로 처리하였을 때 ERK와 p38의 인산화가 증가하여 각 신호전달 경로가 활성화됨을 확인할 수 있었으며, BayK 8644의 처리에 의해 ERK와 p38

의 활성화가 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3A & 3B). 한편 c-fos의 발현을 조사한 결과, BayK 8644는 RANKL에 의한 c-fos의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3C). 이는 BayK 8644가 RANKL에 의한 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 증폭시켜 NFATc1의 발현을 촉진하고, 이로 인해 최종적으로 파골세포 분화가 촉진됨을 시사하는 것이다. 이상의 결과를 통해 L형 칼슘이온 통로 자극에 의한 세포내 칼슘의 유입은 파골세포 분화와 actin ring 형성을 촉진하였으며, 이는 ERK, p38 MAPK 경로를 통한 NFATc1의 활성화가 매개하는 것으로 밝혀졌다.

결 론

BMM 배양계에서 L형 칼슘이온 통로 자극에 의한 세포내 칼슘의 유입은 RANKL에 의한 파골세포 분화와 actin ring 형성을 촉진하였다. 이는 파골세포 분화의 핵심 전사인자인 NFATc1의 활성화를 매개한 것으로 밝혀졌으며, 이의 활성화 기전으로 ERK와 p38 MAPK 경로가 제시되었다. 파골세포 분화에 있어서 L형 칼슘이온 통로의 역할은 본 연구에서 처음으로 규명되었으며, 체내 골 항상성 유지 기전을 밝히는데 기여할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2009학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600 (1988).
- 2) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345 (1999).
- 3) Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlicki, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S. 3rd, Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. : TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25190 (1997).
- 4) 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. USA* **95**, 3597 (1998).
- 5) 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. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165 (1998).
- 6) Suzuki, Y., Inoue, T., Ra, C. : L-type Ca²⁺ channels: a new player in the regulation of Ca²⁺ signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Mol Immunol.* **47**, 640 (2010).
- 7) Lacinová, L. : Voltage-dependent calcium channels. *Gen. Physiol. Biophys.* **24**, Suppl 1, 1 (2005).
- 8) Negishi-Koga, T. and Takayanagi, H. : Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev.* **231**, 241 (2009).
- 9) Shinohara, M. and Takayanagi, H. : Novel osteoclast signaling mechanisms. *Curr Osteoporos Rep.* **5**, 67 (2007).
- 10) Datta, H. K., MacIntyre, I. and Zaidi, M. : The effect of extracellular calcium elevation on morphology and function of isolated rat osteoclasts. *Biosci. Rep.* **9**, 747 (1989).
- 11) Lorget, F., Kamel, S., Mentaverri, R., Wattel, A., Naassila, M., Maamer, M. and Brazier, M. : High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 899 (2000).
- 12) Seales, E. C., Micoli, K. J. and McDonald, J. M. : Calmodulin is a critical regulator of osteoclastic differentiation, function, and survival. *J. Cell. Biochem.* **97**, 45 (2006).
- 13) Miyauchi, A., Hruska, K. A., Greenfield, E. M., Duncan, R., Alvarez, J., Barattolo, R., Colucci, S., Zamboni-Zallone, A., Teitelbaum, S. L. and Teti, A. : Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *J. Cell. Biol.* **111**(6 Pt 1), 2543 (1990).
- 14) Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J. M. : The cell biology of osteoclast function. *J. Cell. Sci.* **113**(Pt 3), 377 (2000).
- 15) Takayanagi, H. : The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1116**, 227 (2007).