



### 저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사학위논문

T 림프구 활성화에 의해 유도되는 RANKL 발현에서  
NFAT의 역할

2013년 2월

서울대학교 대학원

치의학과

허선재

T 림프구 활성화에 의해 유도되는 RANKL 발현에서  
NFAT의 역할

지도교수 백정화

이 논문을 치의학석사학위 논문으로 제출함

2012년 10월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

허선재

허선재의 석사학위 논문을 인준함

2012년 11월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

-국문초록-

## T 림프구 활성화에 의해 유도되는 RANKL 발현에서 NFAT의 역할

허선재

서울대학교 치의학대학원

치의학과

과골세포는 monocyte/macrophage hematopoietic lineage로부터 유래한 조직 특이적 거대 다핵세포로 뼈, 상아질, 석회화된 연골을 파괴할 수 있다. 과골세포의 분화는 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)를 필요로 한다. 류마티스성 관절염 같은 병적인 뼈의 파괴에 IL-17을 생산하는 T 림프구가 관여하며 이 세포는 염증성 cytokine과 함께 RANKL을 발현하여 과골세포의 분화를 촉진한다는 사실이 밝혀졌지만 T 림프구 활성화에 따른 RANKL 발현 증가에 대한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. T 림프구가 활성화되면 nuclear factor activated T cell(NFAT) 신호전달 경로 활성화가 일어나며, 최근에 NFAT이 고농도 세포외 칼슘에 의한 조골세포의 RANKL 발현에 관여한다는 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서는 T 림프구 활성화에 의한 RANKL 발현 증가 과정에 NFAT이 관여하는지 알아보려고 하였다. 생쥐 T 림프구 세포주인 EL-4 cell을 사용하였고, T 림프구 활성화는 1 mM phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 1 mg/ml ionomycin을 처리하여 유도하였다. NFAT 활성화 저해제로 10  $\mu$ g/ml cyclosporin A(CsA)를 사용하였다. NFAT 과발현에 따른 RANKL 발현을 확인하기 위해 lipotransfectamin 2000을 이용해 NFATc1 및 NFATc3 발현 벡터를 전달이입하였다. RANKL과 NFAT의 발현은 역전사-중합효소연쇄반

응(reverse transcription-polymerase chain reaction)과 Western blot 분석을 통해 확인하였다. EL-4 세포주에 PMA와 ionomycin을 8, 12, 24, 48 시간 처리한 후 RANKL 발현을 관찰한 결과 12시간 이후부터 RANKL 발현증가가 확인되었다. CsA로 NFAT 활성화를 저해하면 T 림프구 활성화에 의한 RANKL 증가가 차단되었다. NFATc1 또는 NFATc3 과발현을 유도하였을 때 RANKL 발현이 증가되었다. 이상의 결과는 T 림프구 활성화로 인해 세포 내에서 활성화된 NFATc1 및 NFATc3가 RANKL 발현 증가에 매개자로 작용함을 시사하였다.

---

주요어: T 림프구 활성화, NFAT, RANKL

학번: 2009-22740

목 차

서론

실험 재료 및 방법

결과

고찰

참고문헌

영문초록

## 서론

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 monocyte/macrophage hematopoietic lineage로부터 유래한 조직 특이적 거대 다핵세포로 뼈, 상아질, 석회화된 연골을 파괴하는 역할을 한다. 전통적으로 파골세포는 주로 내분비계에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 그러나 파골세포와 면역세포는 사이토카인, 수용체, 신호물질, 전자조절인자와 같은 여러 조절에 관여하는 분자들을 공유하고 있다. 또한 면역세포는 골수에서 유래하며 파골세포와 같은 미세 환경 속에서 발달하게 된다[2]. 파골세포의 분화는 monocyte/macrophage lineage의 파골전구세포와 뼈에 존재하는 anchorage dependent mesenchymal cell의 세포 간 접촉에 의해 유도된다. 여기서 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)에 의한 신호전달이 필요하다. RANKL은 파골세포와 bone marrow stromal cell에서 주로 분비되지만 그 외에도 활성화된 T 림프구를 포함한 여러 다양한 종류의 세포에서도 발현된다[3].

T 림프구가 활성화 되면 단백질 티로신 키나아제가 활성화되어 티로신 인산화와 phospholipase-C $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ 1) 활성화가 일어난다. PLC- $\gamma$ 1이 세포막 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>)를 inositol 1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>)와 inositol 1,4,5-triphosphate(DAG)로 가수분해하고 IP<sub>3</sub>는 세포체의 IP<sub>3</sub> 수용체에 결합해 세포체로부터 칼슘을 유출시킨다. 증가한 세포 내 칼슘 농도로 인해 세포막 전위가 변화하여 세포막의 칼슘채널을 통해 칼슘이 세포 내로 유입된다. 칼슘 유입으로 인한 세포 내 칼슘농도의 증가는 calmodulin을 통해 calcineurin의 활성화를 유도하고 nuclear factor of activated T cells(NFAT)를 탈인산화 시켜 핵으로

이동하게 한다. 핵 내의 NFAT은 주요 사이토카인을 생성하게 하는 전사조절 인자로 기능하게 된다[4-6].

RANKL은 vitamin D<sub>3</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, 부갑상선호르몬, interleukin(IL)-1, IL-6, IL-7, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등에 의해 발현이 촉진되며 파골세포의 막관통 단백질인 RANK에 결합해 파골세포의 분화를 촉진한다[7,8]. 류마티스 관절염 환자의 연골 활액과 활막에서 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ 의 발현 증가가 관찰되며 이들은 파골세포와 섬유모세포의 RANKL 발현을 증가시켜 뼈 흡수에 관여하는 것으로 알려져 있다[9].

Calcineurin은 칼슘의존성 단백질 인산가수분해효소로 전사인자인 NFAT의 탈인산화를 유도하여 NFAT의 활성화 및 핵내 이동을 야기한다[10,11]. Calcineurin은 일반적으로 cyclosporin A(CsA)와 FK506이라는 면역억제제의 표적이 되어 그 효소 활성이 저해되며 그로 인해 항원이나 세포분열촉진물질에 의해 야기된 T 림프구의 활성화를 저해하게 된다[12,13].

뼈와 면역체계의 연관성에 대한 중요한 예는 뼈의 파괴가 다발성으로 나타나는 류마티스성 관절염과 같은 자가면역성질환이 대표적이다[14]. 활성화된 T 세포에서 발현된 RANKL이 파골전구세포에 직접 작용하여 파골세포 분화 및 세포활성을 증가시켜 골파괴를 유도하는 것으로 알려져 있다[15,16]. IL-17 producing T-helper cell은 염증성 사이토카인과 함께 RANKL을 발현함으로써 파골세포의 분화를 촉진하며[17], 최근 구강의 squamous carcinoma cell을 대상으로 한 실험에서 CXCL13에 의한 RANKL의 발현 증가 과정에서 NFAT이 관여한다는 논문이 발표된 바 있다[17]. 그러나 T 림프구 활성화에 따른 RANKL 발현 증가에 대한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다.

T 림프구가 활성화되면 세포 내 NFAT의 활성화 및 발현 증가가 나타나므로 활성화된 NFAT이 RANKL 발현을 촉진하는 전사인자로 작용할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 칼슘의 유입



을 촉진하는 것으로 알려진 ionomycin과 protein kinase C(PKC)의 활성화를 촉진하는 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)를 사용하여 T 림프구 활성을 유도하고[19,20], RANKL 발현 증가 및 그 과정에서 NFAT의 역할을 확인하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. EL4 cell 배양

실험에는 생쥐 T 림프구 세포주인 EL4 세포를 사용하였다. 세포는 10%의 소태아혈청(FBS)과 100 U/ml penicillin(Thermo; Utah, USA), 2 µl/ml plasmocin(Invivogen; CA, USA)이 포함된 HyQ-RPMI 1640 (Thermo) 배양액으로 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양했다. EL4 세포의 활성화는 1 mM PMA, 1 mg/ml Ionomycin 처리에 의해 유도하였으며 NFAT 활성화를 막기 위해서 10 µg/ml CsA(Sigma; MO, USA)를 사용하였다.

### 2. RNA extraction, Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) and Real-time PCR

NFATc1, NFATc3, RANKL 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자의 mRNA 발현 정도를 관찰하기 위해 easy-Blue<sup>TM</sup> Total RNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology; Sungnam, Korea)을 이용해 배양된 세포의 RNA를 추출한 후, AccuPower RT premix(Bioneer; Daejeon, Korea)를 이용해 cDNA를 제작하고 *i*-star Taq DNA polymerase(iNtRON Biotechnolog)를 이용하여 semiquantitative PCR을 시행하였다. 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV light 하에서 확인하였다. SemiquantitativePCR 조건과 사용된 primer 염기서열은 Table 1, 2 와 같다. 또한 NFATc1, NFATc3, RANKL mRNA의 정량적 관찰을 위해 SYBR *premixEXTaq*(Takara; Otsu, Japan)을 사용하여 real time PCR을 수행하였으며 사용된 primer sequence는 Table 3과 같다.

Table 1. Sequence of PCR primers used for semiquantitative PCR

Genes (Product size)	Primer sequences
RANKL (599 bp)	F: 5'-CAGGTTTGCAGGACTCGAC-3' R: 5'-AGCAGGGAAGGGTTGGACA-3'
NFATc1 (391 bp)	F: 5'-CCACGCCCTGACCACCGATAG-3' R: 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'
NFATc3 (610 bp)	F: 5'-TGGATCTCAGTATCCTTTAA-3' R: 5'-CACACGAAATACAAGTCGGA-3'
GAPDH (572 bp)	F: 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' R: 5'-CGTGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

Table 2. Conditions for semiquantitative PCR

Genes	PCR condition
RANKL	35 cycles of [30 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, 30 sec at 72°C]
NFATc1	40 cycles of [30 sec at 95°C, 30 sec at 54°C, 30 sec at 72°C]
NFATc3	28 cycles of [30 sec at 95°C, 30 sec at 50°C, 30 sec at 72°C]
GAPDH	27 cycles of [30 sec at 95°C, 30 sec at 54°C, 30 sec at 72°C]

Table 3. Sequence of PCR primers used for real time PCR

Genes (Product size)	Primer sequences
RANKL	F: 5'-CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3' R: 5'-CACCATCGCTTTCTCTGCTCT-3'
NFATc1	F: 5'-AATAACATGCGAGCCATCATC-3' R: 5'-TCACCCTGGTGTTCCTTCCTC-3'
NFATc3	F: 5'-TCATGGACTGCTGCAGTCT-3' R: 5'-GGAGCTGAAATGATGGTGA-3'
GAPDH	F: 5'-TCAATGACAACCTTTGTCAAGC-3' R: 5'-CCAGGGTTTCTTACTCCTTGG-3'

### 3. Western blot 분석

세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척 후 protein lysis buffer(10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1 mM EDTA(pH 8.0), 50 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{M}$  leupeptin, 1  $\mu\text{M}$  pepstatin)를 이용해 용해시켜 whole cell lysate를 준비하였다. 핵 단백질 시료는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE Biotechnology; IL, USA)를 이용하였으며 준비하였다. 원심분리한 후 상청액을 채취하여 사용하였으며 modified Bradford reagent(Bio-Rad Laboratories; CA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 5X Laemmli sample buffer에 섞은 후 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gradient gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride membrane에 electrotransfer하였다. RANKL(R&D systems; MN, USA), NFATc1, NFATc3(Santa Cruz; CA, USA)에 대한 일차항체와 rabbit anti-goat IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP(Thermo)를 이용해 immunoblotting을 시행하고 항체가 결합한 단백질 밴드는 Supex reagent(Dyne-Bio; Sungnam, Korea)와 LAS 1000(Fuji photofilm; Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

### 4. Transient transfection

EL4 세포에서 NFATc1과 NFATc3의 과발현이 RANKL 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 이들 발현벡터의 transient transfection을 시행하였다.  $2 \times 10^5$  cells/60 mm dish가 되도록 분주하여 배지의 세포가 70-80%정도 찼을 때, Lipofectamine 2000(Invitrogen; CA, USA)을 이용하여 pcDNA3.1 또는 NFATc1, NFATc3 발현벡터를 transient transfection을 시행하였다. 24시간 후 total RNA를 수집하여 RT-PCR을 수행하거나 단백질 시료를 준비하여 Western blot 분석을 시행하였다.

## 5. Chromatin immunoprecipitation(ChIP) 분석

EL4 cell에 NFATc1과 NFATc3를 transient transfection하여 과발현 시키고 24시간 배양을 시행하였다. 1% formaldehyde로 고정하고 세포를 용해시킨 후 200-800 bp의 크기로 DNA가 절단되도록 sonication을 시행하였다. NFATc1 또는 NFATc3 일차항체와 protein G agarose로 면역침강을 시행하고 침전물에 포함된 DNA를 분리한 후 아래와 같은 primer를 사용해 생쥐 RANKL promoter의 -1070~-858 bp 부위를 증폭시켰다; Forward 5'-GCAAGCTCCAGGCCAGCCTAG-3', Reverse 5'-CCAATAAGACGGCTCAGCTG-3'[21].

## 결 과

### 1. 활성화 시간에 따른 RANKL의 발현

먼저 활성화된 T 림프구에서 RANKL이 발현되는 시기를 확인하고자 EL4 세포에 ionomycin과 PMA를 처리하고 8, 24, 48시간 배양한 후 total RNA를 준비하여 RT-PCR을 시행하였다. 활성화 시킨 후 24 시간이 경과한 실험군에서 RANKL이 발현되었고 48시간까지 지속되었다 (Fig. 1A). RANKL 단백질의 발현을 관찰하기 위해 8, 12, 24 시간 시료로 western blot 분석을 시행한 결과, 12 시간부터 증가하기 시작하여 24시간에 RANKL 단백질의 발현이 가장 뚜렷하게 나타났다(Fig. 1B).

### 2. NFAT 활성화 억제가 RANKL 발현에 미치는 영향

T 림프구 활성화에 의해 유도된 RANKL 발현에 NFAT이 관여하는지를 확인하기 위해 calcineurin 저해제로 알려진 CsA를 처리하여 RANKL 발현의 변화를 관찰하였다. EL4 세포에 CsA를 30분 전처리하고 PMA와 ionomycin를 24 시간동안 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 유전자의 mRNA 발현의 증가가 관찰되었으나 CsA를 처리하면 단백질과 mRNA 증가가 모두 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2B, 2C).

### 3. NFATc1과 NFATc3 과발현이 RANKL 발현에 미치는 영향

앞의 결과는 활성화된 T 림프구에서의 RANKL 발현에 NFATc1과 NFATc3이 관련할 수 있음을 시사하였다. 따라서 이를 좀더 확인하기 위해 EL4 세포에 NFATc1 또는 NFATc3를 과발현시켜 RANKL의 발현을 직접적으로 조절하는지를 관찰하였다. NFATc1 또는 NFATc3의 과발현은 RANKL의 mRNA와 단백질의 발현을 증가시켰다(Fig. 3). 한편 NFATc1의 과발현은 NFATc3의 발현을 증가시켰으나 NFATc3의 과발현은 NFATc1의 발현에 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과는 NFATc1과 NFATc3가 RANKL의 발현 증가에 관여하며 NFATc3는 NFATc1에 의해 발현이 증가됨을 보여주었다[21].

### 4. NFATc1과 NFATc3의 RANKL promoter 결합 확인

NFATc1과 NFATc3 과발현이 RANKL 발현을 증가시킨 결과를 바탕으로, 이들 NFAT 전사인자가 RANKL promoter에 직접 결합하여 RANKL 전사를 조절하는지 알아보기 위해 ChIP 분석을 수행하였다. CsA 전처치가 있거나 없는 상태에서 EL4 세포에 ionomycin과 PMA를 24시간 처리한 후 NFATc1과 NFATc3 일차 항체를 사용하여 ChIP를 시행하였다. 기존 보고에서 NFAT이 결합하는 것으로 알려진 RANKL 프로모터 부위에 대해 PCR을 수행한 결과, 활성화 시킨 EL4 세포에서는 RANKL promoter에 NFATc1과 NFATc3의 결합이 증가하였으나 CsA를 함께 처리한 세포에서는 NFATc1과 NFATc3의 결합 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과는 T 림프구의 활성화가 일어날 때 NFAT 전사인자가 활성화되어 핵내로 들어간 후 RANKL promoter에 결합하여 RANKL 전사를 촉진시킴을 시사하였다.

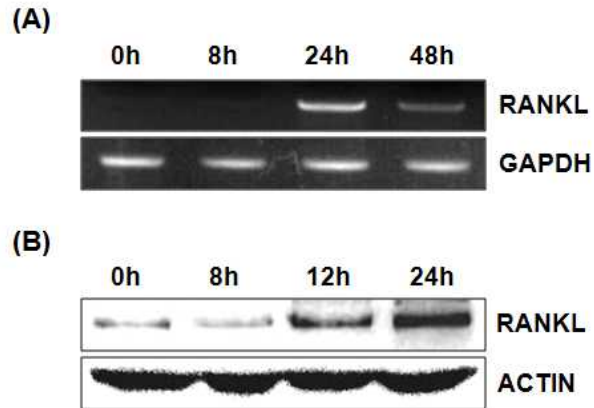


Fig. 1. T cell activation by ionomycin and PMA increased expression levels of RANKL mRNA and protein. Activation of EL-4 cells were induced by 1 mM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mg/ml ionomycin and incubated for the indicated periods. Then, semiquantitative RT-PCR(A) or western blot analysis(B)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



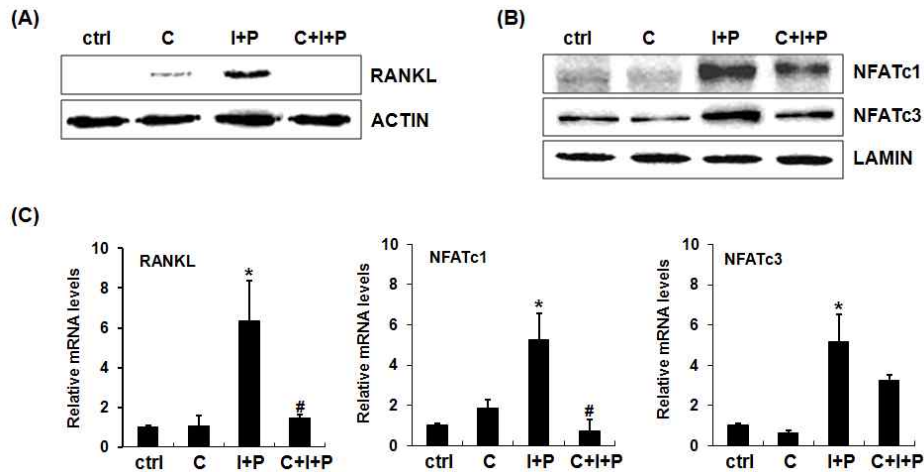


Fig. 2. Inhibition of NFAT activation by cyclosporin A blocked T cell activation-induced RANKL expression. EL-4 cells were treated with 1 mM PMA (P) and 1 mg/ml ionomycin (I) in the presence or absence of 10 μg/ml CsA (C) for 24 h. Then, whole cell protein (A) or nuclear protein (B) or total RNA (C)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

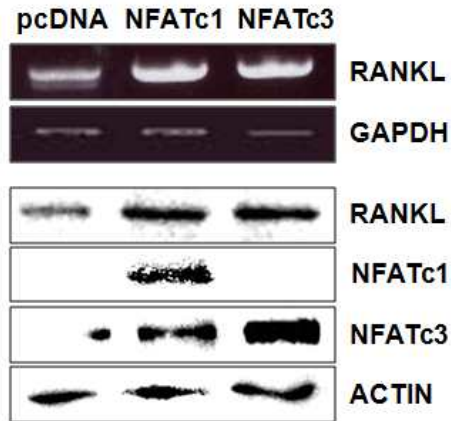


Fig. 3. Overexpression of NFATc1 or NFATc3 increased RANKL expression. EL-4 cells were transfected with NFATc1 or NFATc3 expression vectors and incubated for 24 h. Semi-quantitative RT-PCR (upper panel) and western blot analysis (lower panel) were performed.

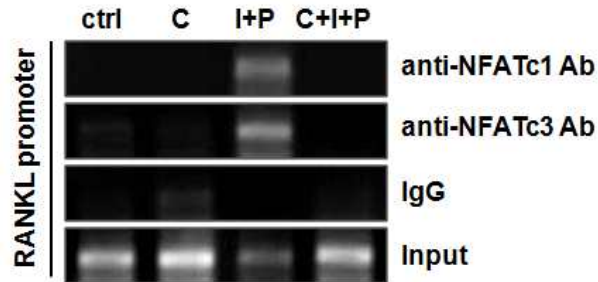


Fig. 4. Both NFATc1 and NFATc3 bind to the RANKL promoter. EL-4 cells were treated with ionomycin (I) and PMA (P) in the presence or absence of CsA (C) for 24 h and then chromatin immunoprecipitation was performed using anti-NFATc1 antibody, anti-NFATc3 antibody or normal IgG. Using DNA fragments eluted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

## 고 찰

본 실험에서는 생쥐 T 림프구 세포주인 EL-4 세포를 이용하여 전사인자인 NFATc1과 NFATc3가 T 세포 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[22]. 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, RANKL 프로모터에 NFATc1 및 NFATc3가 결합함을 확인하였다. 이러한 결과는 T 세포 활성화에 의해 유도된 RANKL 발현에서 NFAT 전사인자가 중요한 역할을 담당함을 보여주는 결과로 생각된다.

CsA은 면역억제제로 세포 내에서 cyclophilin과 복합체를 이루어 칼슘 의존성 인산가수분해효소인 calcineurin을 억제함으로써 NFAT의 핵내 이동과 NFAT에 의해 조절되는 유전자의 전사를 저해하는 역할을 한다[23-26]. 본 연구에서 PMA와 ionomycin을 처리했을 때 증가된 RANKL의 발현은 CsA를 함께 처리하자 감소되었다. NFAT은 세포내 칼슘 증가와 protein kinase C에 의해 활성화되며 표적 유전자의 전사를 유도한다[22]. 본 연구에서 PMA와 ionomycin은 NFATc1과 NFATc3 발현을 모두 증가시켰다. 그리고 CsA을 처리하여 NFAT 탈인산화를 저해하면 RANKL과 마찬가지로 NFATc1과 NFATc3의 발현이 감소되었다. 이러한 결과는 T 세포 활성화에 의한 RANKL의 발현은 세포 내 칼슘의 농도 증가에 의해 활성화되는 calcineurin-NFAT 신호전달을 필요로 함을 시사한다.

NFATc1과 NFATc3가 RANKL의 발현에 미치는 영향을 좀 더 직접

적으로 알아보기 위해 NFATc1과 NFATc3 expression vector를 EL-4 cell에 transfection 시킨 뒤 RANKL 발현이 어떻게 달라지는지 알아보았다. 그 결과 NFATc1과 NFATc3를 과발현시킨 실험군 모두에서 RANKL mRNA와 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NFAT 발현의 증가만으로도 T 세포에서 RANKL의 발현을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 한편 NFATc1을 과발현 시킨 경우 NFATc1과 NFATc3의 발현이 모두 증가하였으나 NFATc3를 과발현시켰을 때는 NFATc1의 증가는 관찰되지 않았다. 이를 통해 NFATc1이 NFATc3의 발현에 관여하는 인자로 작용할 수 있음을 알 수 있었으며 이러한 결과는 기존의 보고와 동일하였다[21]. 또한, 활성화된 EL-4 세포는 RANKL promoter에 NFATc1 및 NFATc3의 결합을 증가시킨다는 것을 ChIP 분석을 통해 확인하였고, 이는 T 림프구에서 NFATc1 또는 NFATc3가 RANKL의 발현 조절에 중요한 요소임을 알 수 있다. 기존 Lee 등의 보고에서 조골세포의 경우 세포외 고농도 칼슘을 처리하여 세포 내 칼슘 농도를 증가시키면 NFATc3가 RANKL promoter에 결합하여 RANKL 발현을 증가시키지만 NFATc1은 promoter에 직접 결합하지 않는다고 하였다[21]. 본 연구에서는 NFATc1도 RANKL promoter에 결합하는 것으로 나타나 이러한 차이가 나타나는 이유는 확실하지 않으나 세포 차이에 따라 전사인자의 작용에 차이가 있었을 가능성이 있는 것으로 추정된다.

활성화된 T 세포에서 분비된 RANKL은 파골세포 전구세포의 RANK에 결합해 파골세포의 분화와 활성화를 유발하여 골 흡수를 야기한다[1,27]. T 세포는 다양한 미생물로부터 숙주를 방어하고자 하는 면역 반응을 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.

## 참 고 문 헌

- [1] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
- [2] Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual review of immunology* 2006;24:33-63.
- [3] Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Annals of the New York academy of sciences* 2011;1240:E13-8.
- [4] Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A. Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;311:1117-32.
- [5] Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* 2003;17:2205-32.
- [6] Oh-hora M, Rao A. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. *Microbes and infection/Institut Pasteur* 2009;11:612-9.
- [7] Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;275:768-75.
- [8] Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual review of*

- immunology 2002;20:795-823.
- [9] Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature reviews Immunology* 2007;7:292-304.
- [10] Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiological reviews* 2000;80:1483-521.
- [11] Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Developmental biology* 2004;266:1-16.
- [12] Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions* 1976;6:468-75.
- [13] Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of antibiotics* 1987;40:1256-65.
- [14] Okamoto K, Takayanagi H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis research & therapy* 2011;13:219.
- [15] Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;265:144-50.
- [16] Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304-9.

- [17] Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *Journal of immunology* 2003;170:2655-62.
- [18] 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. *Molecular cancer research : MCR* 2009;7:1399-407.
- [19] 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. *The Biochemical journal* 1994;300(Pt 3):665-72.
- [20] Zhao Y, Koebis M, Suo S, Ohno S, Ishiura S. Regulation of the alternative splicing of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase1 (SERCA1) by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) via a PKC pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 2012;423:212-7.
- [21] Lee HL, Bae OY, Baek KH, Kwon A, Hwang HR, Qadir AS, et al. High extracellular calcium-induced NFATc3 regulates the expression of receptor activator of NF-kappaB ligand in osteoblasts. *Bone* 2011;49:242-9.
- [22] Boss V, Talpade DJ, Murphy TJ. Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:10429-32.
- [23] 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;352:803-7.
- [24] 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;66:807-15.
- [25] 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;357:692-4.
- [26] Pinkas-Kramarski R, Edelman R, Stein R. Indications for selective coupling to phosphoinositide hydrolysis or to adenylate cyclase inhibition by endogenous muscarinic receptor subtypes M3 and M4 but not by M2 in tumor cell lines. *Neuroscience letters* 1990;108:335-40.
- [27] Okamoto K, Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *International immunopharmacology* 2011;11:543-8.

## Abstract

### NFAT is involved in T lymphocyte activation-induced RANKL expression

Sun-Jae Heo

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Osteoclast is a terminally differentiated multinucleated cell derived from monocyte/macrophage lineage precursors cells. It is involved in destruction of mineralized tissues such as bone, dentin and calcified cartilage. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) is an essential cytokine for osteoclast differentiation, activation and survival. T lymphocytes such as T<sub>17</sub> cells, a subset of T helper cells producing IL-17, play an important role in rheumatoid arthritic bone resorption via producing inflammatory cytokines and RANKL. It has not been clearly elucidated how T cell activation induces RANKL expression. T cell receptor activation induces activation of nuclear factor activated T cell (NFAT) and expression of its target gene. Recently it has been published that NFAT is involved in high extracellular calcium-induced RANKL expression in osteoblasts. Therefore, in this study, I examined the role of NFAT in T cell activation-induced RANKL expression. EL-4, a murine T lymphocytic cell line, was used in this study. T cell activation was induced by addition of 1 mM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mg/ml ionomycin to culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin). To suppress NFAT activation, cells were pre-incubated

with 10 µg/ml cyclosporin A(CsA) for 30 min before the addition of PMA and ionomycin. To observe the direct effect of NFATc1 or NFATc3 on RANKL expression, cells were transiently transfected with plasmid encoding NFATc1 or NFATc3 by using lipotransfectamin 2000. Expression levels of RANKL or NFAT were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot analysis. T cell activation by PMA and ionomycin increased expression levels of RANKL in time-dependent manner. CsA blocked T-cell activation induced RANKL expression. Overexpression of NFATc1 or NFATc3 increased RANKL expression. These result suggest that T cell receptor activation-induced NFAT activation mediates RANKL expression in T lymphocytes.

---

Keywords: T cell activation, NFAT, RANKL

Student Number: 2009-22740