

High Extracellular Calcium Increased Expression of Ank, PC-1 and Osteopontin in Mouse Calvarial Cells

Mina Song, Hyun-Mo Ryoo, Kyung Mi Woo, Gwan-Shik Kim, and Jeong-Hwa Baek*

Department of Cell & Developmental Biology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University

(Received February 27, 2008 ; Accepted March 19, 2008)

In the process of bone remodeling, mineral phase of bone is dissolved by osteoclasts, resulting in elevation of calcium concentration in micro-environment. This study was performed to explore the effect of high extracellular calcium (Ca^{2+}) on mineralized nodule formation and on the expression of progressive ankylosis (Ank), plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1) and osteopontin by primary cultured mouse calvarial cells. Osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation was induced by culture of mouse calvarial cells in osteoblast differentiation medium containing ascorbic acid and β -glycerophosphate. Although Ank, PC-1 and osteopontin are well known inhibitors of mineralization, expression of these genes were induced at the later stage of osteoblast differentiation during when expression of osteocalcin, a late marker gene of osteoblast differentiation, was induced and mineralization was actively progressing. High Ca^{2+} (10 mM) treatment highly enhanced mRNA expression of Ank, PC-1 and osteopontin in the late stage of osteoblast differentiation but not in the early stage. Inhibition of p44/42 MAPK activation but not that of protein kinase C suppressed high Ca^{2+} -induced expression of Ank, PC-1 and osteopontin. When high Ca^{2+} (5 mM or 10 mM) was present in culture medium during when mineral deposition was actively progressing, matrix calcification was significantly increased by high Ca^{2+} . This stimulatory effect was abolished by pyrophosphate (5 mM) or levamisole (0.1-0.5 mM), an alkaline phosphatase inhibitor. In addition, probenecid (2 mM), an inhibitor of Ank, suppressed matrix calcification in both control and high Ca^{2+} -treated group, suggesting the possible role of Ank in matrix calcification by osteoblasts. Taken together, these results showed that high Ca^{2+} stimulates

expression of Ank, PC-1 and osteopontin as well as matrix calcification in late differentiation stage of osteoblasts and that p44/42 MAPK activation is involved in high Ca^{2+} -induced expression of Ank, PC-1 and osteopontin.

Key Words: high extracellular calcium, osteoblast, matrix calcification, Ank, PC-1, osteopontin

서 론

세포의 칼슘은 세포 성장, 분화, 이동 등 다양한 세포 활성에 영향을 미치므로 혈중 칼슘농도는 항상 아주 좁은 범위 내로 유지되도록 정교한 조절을 받는다(Brown과 MacLeod, 2001). 그러나 골조직의 경우 골 개조 과정 중 파골세포에 의한 골 흡수를 통해 칼슘이온이 유리되므로 혈중 칼슘 농도보다 세포의 칼슘농도가 상당히 높은 미세 환경이 만들어지며(Silver 등, 1988), 고농도 세포의 칼슘이 골조직을 구성하는 여러 세포의 분화 및 활성을 조절한다는 것이 잘 알려져 있다(Dvorak과 Riccardi, 2004). 특히 조골세포의 경우 고농도 세포의 칼슘에 의한 세포 이동 및 증식 촉진 효과가 잘 알려져 있으며, 고농도 세포의 칼슘이 조골세포의 분화를 촉진한다는 보고도 있었다(Godwin과 Soltoff, 1997; Yamaguchi 등, 2000; Dvorak 등, 2004; Yamauchi 등, 2005). 본 연구진은 고농도 세포의 칼슘이 조골세포에서 RANKL의 발현을 증가시켜 파골세포 분화를 촉진함을 관찰하였으며, 파골세포 분화 촉진과 관련하여 고농도 세포의 칼슘이 조골세포 및 파골세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 oligo chip 분석을 진행한 결과 조골세포 분화와 관련된 것으로 알려진 여러 유전자의 발현이 고농도 칼슘에 의해 조절되고 있음을 보고한 바 있다(Kim 등, 2003, 2006). 이의 후속 연구에서 생쥐 두 개골에서 얻어진 세포를 이용한 oligo chip 분석 결과, 고

*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Cell and Developmental Biology, 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

농도 세포의 칼슘에 의해 발현이 크게 증가된 유전자들 중에는 hydroxyapatite 결정 생성 및 성장의 억제에 관련된 것으로 알려진 progressive ankylosis (Ank), plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1), osteopontin (OPN)이 포함되어 있었다.

Pyrophosphate는 hydroxyapatite 결정의 성장을 저해하는 대표적인 억제인자이며, 이러한 pyrophosphate의 생성 또는 제거에 영향을 미치는 유전자 중 Ank, PC-1, tissue nonspecific alkaline phosphatase (ALP)가 잘 알려져 있다 (Harmey 등, 2004; Addison 등, 2007). Ank는 세포막 단백질로 세포 내에서 세포 외부로 pyrophosphate를 수송하는 음이온 수송체로 작용하며, 연골, 골조직과 더불어 다양한 연조직에서도 발현이 관찰된다(Ho 등, 2000). Ank 유전자의 돌연변이로 그 기능이 결핍된 ank/ank 생쥐에서는 세포의 pyrophosphate 농도가 감소하여 정상적으로 석회화가 일어나지 않는 관절, 인대 등의 조직에 병적 석회화가 심하게 진행된다(Hakim 등, 1994; Ho 등, 2000). PC-1은 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1이라고도 불리는 효소로, ATP 같은 nucleotide를 기질로 사용하여 pyrophosphate를 생산하며 그로 인해 세포 내외의 pyrophosphate 농도를 높여주는 기능을 한다(Johnson 등, 1999a). PC-1은 정상적 석회화가 진행되는 조직에서 기질소포(matrix vesicle)에도 존재하며, Ank와 유사하게 골조직, 연골 등 다양한 조직에서 발현되고, 병적 석회화 진행을 억제하는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Okawa 등, 1998; Johnson 등, 1999b). PC-1 유전자 발현을 없애준 생쥐나 PC-1 유전자의 돌연변이로 기능을 상실한 *ttw/ttw* 생쥐의 경우 *ank/ank* 생쥐와 거의 유사한 병적 석회화가 관절, 인대 등 여러 부위에서 관찰된다(Okawa 등, 1998; Anderson 등, 2005). 또한 사람에서도 idiopathic infantile arterial calcification이 PC-1의 기능 결핍과 관련된 것으로 보고되었다(Rutsch 등, 2001, 2003). ALP는 pyrophosphate를 inorganic phosphate로 전환할 수 있으며, ALP가 결핍되면 체내 pyrophosphate 농도가 높아지고 골연화증을 가져오는 것으로 알려졌다(Whyte, 1994; Fedde 등, 1999). ALP가 결핍된 생쥐에 Ank 또는 PC-1의 발현을 동시에 억제하면 골연화증이 상당부분 개선되고 관절, 인대 등의 병적 석회화도 많이 완화됨이 관찰되어, 이들 유전자가 석회화결절 형성에 필요한 inorganic phosphate와 결정형성 저해제인 pyrophosphate간 균형을 조절하여 특정 조직의 석회화 진행 여부를 조절할 것으로 여겨지고 있다(Hessle 등, 2002; Harmey 등, 2004). OPN은 골조직을 포함한 여러 조직에서 광범위하게 발현되는 세포의 기질 단백질로 pyrophosphate와 유사하게 hydroxyapatite 결정 성장을 저해하여 병적 석회화 억제에 관여할 것으로 알려졌으며, 또한 Ank나 PC-1에 의해 pyrophosphate 농도가 높아지면 OPN 발현이 증가되고 이를 통해 병적 석회화 억제작용이 나타난다는 보고도 있었다(Hunter 등, 1994; Jono 등, 2000; Johnson 등,

2003; Harmey 등, 2006; Addison 등, 2007).

이러한 선행 연구 결과를 고려해 볼 때, 고농도 세포의 칼슘이 Ank, PC-1, OPN 발현을 증가시킨다는 oligo chip 분석 결과는, 고농도 세포의 칼슘이 조골세포 분화와 석회화결절 형성을 촉진시킨다는 기존의 보고와는 일견 서로 일치하지 않는 것으로 생각되었다. 따라서 본 연구에서는 생쥐 두개골에서 얻어진 일차 배양 세포를 이용하여 조골세포 분화를 유도하고 그 과정 중 Ank, PC-1, OPN 유전자의 발현이 어떻게 변화하는지 살펴보고, 고농도 세포의 칼슘이 조골세포에 의한 석회화 결절 형성에 미치는 영향 및 그 과정에서 이들 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

생쥐 두개골 세포의 분리 및 배양

생후 1일된 ICR 생쥐(샘타코, 오산)의 전두골 및 두개골을 분리하고, 0.1% collagenase, 0.05% trypsin, 0.5 mM EDTA가 포함된 효소용액으로 10분씩 3번 처리하여 분리된 세포는 버리고, 그 후 20분씩 3번 처리하여 얻은 세포를 모두 모아서 사용하였다. 이 세포의 증식을 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 섞은 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Gibco BRL)에서 배양하였다. 이차 계대 배양한 세포를 이용하여 실험을 진행하였으며, 조골세포 분화를 유도하기 위해 세포가 배양접시에 가득 차면 조골세포 분화배지로 교체하였다. 분화배지의 조성은 기존에 잘 알려진 10% FBS, 10 mM β-glycerophosphate, 50 µg/ml ascorbic acid를 포함한 α-minimum essential medium (α-MEM, Cambrex, Walkersville, MD, USA)이며, 여기에 본 연구진의 선행 연구에서 생쥐 두개골 세포의 분화 및 석회화결절 형성을 크게 촉진하는 것으로 밝혀진 20 mM N-acetyl-L-cysteine (SIGMA, Steinheim, Germany)을 추가하여 사용하였다(Jun 등, 2008). 필요한 경우 분화배지에서 10 mM β-glycerophosphate 대신 10 mM sodium phosphate (Na₂HPO₄와 NaH₂PO₄의 4:1 혼합물)를 사용하기도 하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

두개골 세포를 60 mm 배양접시에 4×10^4 cells/cm² 밀도로 분주한 후, 세포가 가득 차면 조골세포 분화배지로 교체하여 명시된 기간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 easy-BLUE™ RNA Extraction Reagent (Intron Biotechnology, 서울)를 이용하여 total RNA를 분리하고, AccuPower RT PreMix (Bioneer, 대전)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 TaKaRa Taq polymerase (TaKaRa, 일본)를 이용하여 PCR

을 시행하였다. RT-PCR을 시행한 유전자는 Ank, PC-1, OPN, ALP, type I collagen (Coll1a1), osteocalcin (OCN), bone sialoprotein(BSP), Pit-1이며, 이들 유전자의 PCR에 사용한 primer 서열은 Table 1과 같다. PCR 산물 10 μ l를 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

von Kossa 염색

석회화 결절의 형성을 확인하기 위해 von Kossa 염색을 시행하였다. 두개골 세포를 4 well 접시에 2×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 증식배지에서 2일간 배양하였다. 이후 조골세포 분화배지로 교체하여 배양하면서 매 2일 마다 새로운 배양액으로 교체하였다. 배양기간 중 계속 현미경으로 관찰하여 다층으로 자라난 세포 결절이 충분히 만들어지는 시기를 확인하고, 배양 전체 기간, 또는 세포 결절은 충분히 만들어졌지만 아직 석회화가 관찰되지 않는 시점까지의 조골세포 배양 초기, 또는 이미 만들어진 세포 결절에 석회화가 활발히 진행되는 배양 후기로 각각 실험군을 나누어 고농도 세포의 칼슘을 처리하였다. 배양이 끝난 뒤 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하고 10% neutral buffered formalin에서 30분간 고정하고, 5% silver nitrate 용액에서 15분간 염색을 시행한 후 증류수로 세척하고 관찰하였다.

조골세포의 분화가 정상적으로 진행되기 위해서는 제1형 교원섬유 기질의 침착이 필요하고, ascorbic acid는 이 과정의 필수요소이다(Stein 등, 1996). 따라서 조골세포 분화가 유도되지 않는 상태에서 고농도 세포의 칼슘에

Table 1. Sequences of PCR primers and the expected size of PCR products.

Genes (product size)	Primer Sequences
Ank (356 bps)	F: 5'-CAAGAGAGACAGGGCCAAA-3' R: 5'-ACAGAGACAGGATGGGGAT-3'
PC-1 (698 bps)	F: 5'-CGGATTCTACTGAAGCAGCA-3' R: 5'-ATGAGTTCACGTCTGTGAC-3'
OPN (481 bps)	F: 5'-CGATGATGATGACGATGGA-3' R: 5'-GGCTTTGGAACCTTGCTTGA-3'
ALP (439 bps)	F: 5'-AGGCAGGATTGACCACGG-3' R: 5'-TGTAGTTCGCTCATGGA-3'
Runx2 (289 bps)	F: 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3' R: 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'
Coll1a1 (351 bps)	F: 5'-GAAGTCAGCTGCATACAC-3' R: 5'-AGGAAGTCCAGGCTGTCC-3'
OCN (611 bps)	F: 5'-CCTGAAGGTCTCACAATCTGC-3' R: 5'-CACAAGCAGGGTTAAGCTCAC-3'
BSP (375 bps)	F: 5'-GTCAACGGCACCAGCACCAA-3' R: 5'-GTAGCTGTATTCGTCCTCAT-3'
Pit-1 (333 bps)	F: 5'-GTGGGATGTGCAGTTTTCTGT-3' R: 5'-GGTGCTGTCTATGCTGGTCTC-3'
GAPDH (572 bps)	F: 5'-TCACCATCTCCAGGAGCG-3' R: 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3'

의한 석회화가 진행되는지 확인하기 위해, 세포 배지에서 ascorbic acid를 제거하고(10% FBS, 10 mM β -glycerophosphate, 20 mM N-acetyl-L-cysteine이 함유된 DMEM) 10일간 배양하면서 고농도 칼슘을 처리하고 von Kossa 염색을 시행하였다.

석회화 기질 내 칼슘 정량

두개골 세포를 48 well 접시에 5×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고, von Kossa 염색에서 기술한 바와 같이 석회화를 유도한 후, 배양 10일째 세포를 칼슘과 마그네슘이 함유되지 않은 PBS로 세척하고 0.5 N HCl을 24시간 처리하여 석회화 기질의 탈회를 유도하였다. 이 시료를 CALCIUM assay kit(SIGMA-DIAGNOSTICS, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 반응시킨 후 575 nm에서 흡광도를 측정하여 칼슘을 정량하였다.

ALP 염색

von Kossa 염색에서와 같이 조골세포 분화를 유도하고, 세포결절은 뚜렷이 관찰되지만 아직 석회화는 관찰되지 않는 시점에 고농도 세포의 칼슘을 48시간 처리한 후 Alkaline Phosphatase histochemical staining kit (SIGMA-DIAGNOSTICS)를 이용하여 ALP 염색을 시행하였다.

세포사(apoptosis) 분석

생쥐 두개골 세포를 24-well 접시에 2×10^5 cells/well의 밀도로 분주한 후, 다음날 고농도 칼슘을 첨가하거나 첨가하지 않고 세포 증식배지에서 2일간 배양하였다. 세포사가 진행된 세포를 분석하기 위해 TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 annexin V를 염색한 후 annexin V 양성인 세포의 분획을 FACS Calibur (Beckton-Dickinson, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

Pyrophosphate 정량

배양액내 pyrophosphate 양을 측정하기 위해, von Kossa 염색에서와 같이 세포를 준비하고 세포결절 형성을 유도하였다. 세포 결절이 충분히 형성되었을 때 고농도 칼슘을 첨가하거나 첨가하지 않고 4일간 배양한 후 배양액을 모아 실험에 사용하였다. Pyrophosphate의 정량은 1.0 mM pyrophosphate tetrasodium salt를 표준용액으로 사용하고 reconstituted pyrophosphate reagent (SIGMA)에 시료를 희석하여 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

저해제의 사용

고농도 칼슘에 의한 유전자 발현 변화에 관련된 세포 신호전달 과정을 확인하기 위해, 위에서 기술한 바와 같이 세포결절 형성을 유도한 후, 고농도 칼슘 처리 30분

전부터 MEK1/2 저해제인 U0126(20 μ M, Promega, Madison, WI, USA) 또는 protein kinase C (PKC) 저해제인 GF-109230X (1 μ M, Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 첨가하여 배양하였다. 48시간 후 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 유전자 발현변화를 관찰하였다.

또한 기질 석회화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포결절 형성을 유도하고, 고농도 칼슘을 처리하기 30분 전부터 10 mM pyrophosphate (SIGMA), 0.1-0.5 mM levamisole (ALP 저해제, SIGMA), 또는 2 mM probenecid (Ank 저해제, SIGMA)를 첨가하여 3일간 배양 후 von Kossa 염색을 시행하였다.

실험 결과 및 고찰

골 개조 과정 중 골 형성은 파골세포에 의한 골흡수가 이루어진 부위로 조골세포 전구세포가 이동하고 조골세포로의 분화과정을 거치면서 골기질 침착 및 석회화의 진행을 통해 이루어진다. 파골세포에 의한 골 흡수 결과 국소적 미세 환경에서 혈액 내 농도보다 상당히 높은 칼슘농도가 형성되므로 이러한 고농도 칼슘은 조골세포에 의한 골 형성과정에 영향을 미칠 가능성이 높다. 고농도 칼슘에 의한 조골세포 이동, 증식, 분화 촉진효과를 기술한 이전의 보고들은 이러한 가능성을 지지하는 것으로 생각된다(Dvorak과 Riccardi, 2004). 세포의 칼슘뿐 아니라 inorganic phosphate도 hydroxyapatite의 중요 구성성분이므로 석회화 과정에 영향을 미칠 가능성이 있으며, 배양액내 inorganic phosphate 농도를 높여주는 것이 hydroxyapatite 결정 생성에 필수적임이 잘 알려져 있다(Bellows 등, 1991, 1992). 이러한 inorganic phosphate의 효과는 hydroxyapatite 결정 생성에 직접 사용되는 구성요소로서의 역할 뿐 아니라, inorganic phosphate가 조골세포 내부로 들어가 유전자 발현조절을 통해 간접적으로도 석회화 결절형성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Beck, 2003; Beck 등, 2003). 고농도 세포의 칼슘이 조골세포의 ALP 발현을 증가시키고 석회화결절 생성을 증가시킨다는 보고는 있었지만, pyrophosphate와 phosphate간 균형 조절에 관여하는 다른 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해서는 알려지지 않았다. 또한 조골세포에서 Ank과 PC-1이 발현됨은 잘 알려져 있지만, 생쥐 일차배양세포의 조골세포 분화과정에 따른 이들 유전자의 발현 변화에 대해서는 확실히 규명되어 있지 않아 본 연구를 수행하였다.

생쥐 두개골 세포를 조골세포 분화배지에서 배양하면, 매번 얻어진 세포의 상태에 따라 석회화 결절이 관찰되는 기간에 차이가 있으나, 대략 5-8일 정도 배양하면 다층으로 자라난 세포 및 그에 의해 분비된 세포의 기질로 구성된 뚜렷한 세포결절이 관찰된다. 또한 대략 7-9일 정도 배양하면 이러한 세포결절 부위에서 석회화가 관찰되

기 시작하며, 배양을 지속하면 석회화가 증가, 유지되다가 14-16일 정도가 되면 급격한 세포사의 진행이 관찰되면서 배양접시에서 세포 및 석회화결절의 탈락이 일어난다. 이러한 세포사의 진행은, 흰쥐 조골세포를 이용한 기존의 보고와 유사하며, 체내의 골 형성 과정에서 골기질 침착에 관여하는 조골세포의 일부만이 골세포(osteocyte)나 골이장세포(bone lining cell)로 전환되고 나머지는 세포사가 진행되는 현상과 일치한다(Lynch 등, 1998). 이러한 분화조건에서, 분화진행에 따른 유전자 발현 변화를 알아보고자 0, 2, 4, 6, 11일 째 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 1). 잘 알려진 바와 같이 ALP, Col1a1의 발현은 분화 초기부터 발현 증가가 관찰되기 시작하였으며, 조골세포 분화 후기 표지인 BSP와 OCN의 발현도 배양기간 후반에 발현 증가가 관찰되었다. Ank, PC-1, OPN의 발현도 OCN 발현과 유사하게 6일째부터 발현이 관찰되었으며, 11일에는 그 양이 더 증가하였다. OPN이 조골세포 분화 후기에 발현이 증가하는 것은 기존의 보고와 일치하며, 생체 내에서도 골조직 구성세포 중 골세포에서 OPN의 발현이 높게 관찰되는 것으로 알려져 있다(Zhu 등, 2001; Aubin과 Liu, 1996; Stein 등, 1996). Ank의 발현 양상은, MC3T3-E1 세포의 분화가 진행됨에 따라 Ank mRNA 발현이 증가한다는 기존의 보고와 유사하였다(Hatch 등, 2005). PC-1의 경우, 본 연구 결과는 MC3T3-E1 세포나 생쥐 두개골 세포에서 모두 PC-1이 항상 일정하게 발현된다고 한 Johnson 등(2000)의 보고와는 달랐지만, MC3T3-E1 세포를 이용한 조골세포 분화 유도 시 PC-1 mRNA 및 단백질의 발현이 분화 후기에 증가한다는 Johnson 등(1999b)의 보고나 생쥐 두개골 조골세포의 분화과정에서 분화후기에 PC-1 mRNA 발현이 증가하고 배양액내 pyrophosphate양도 증가한다는 Harme

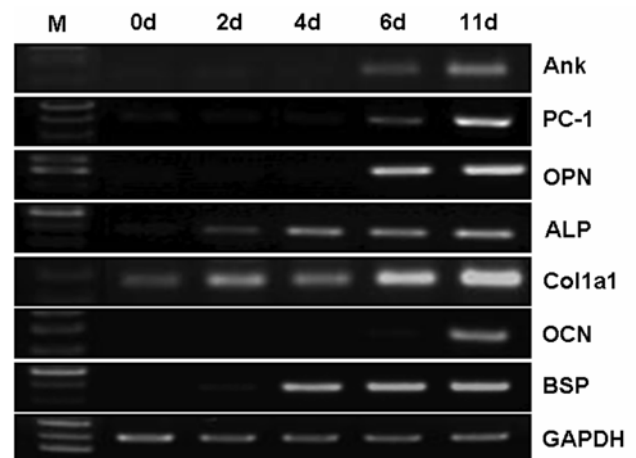


Fig. 1. Gene expression patterns during osteoblast differentiation. Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium as described in Materials and Methods for the period indicated. Then total RNAs were isolated and gene expression level was examined by semiquantitative RT-PCR.

등(2004)의 보고와는 일치하였다. 이러한 결과는 정상적인 조골세포의 분화과정 중 특히 세포의 기질에 석회화가 진행되는 시기와 비슷한 시기에 pyrophosphate 생산 및 분비를 증가시키거나 또는 hydroxyapatite 결정에 결합하여 더 이상의 결정 성장을 억제하는 Ank, PC-1, OPN의 발현이 증가함을 보여주었다.

기존의 oligo chip 분석 결과를 확인하기 위해 조골세포 분화배지에 고농도 세포의 칼슘(10 mM)을 처리하고 유전자 발현을 확인하였다. Ank, PC-1, OPN의 발현이 조골세포 분화 후기에 주로 관찰되었으므로 조골세포 분화배지에서 10일간 배양한 조건에서 그 효과를 확인하였다. 10일간 계속 고농도 칼슘을 처리한 경우 Ank, PC-1, OPN의 발현이 대조군에 비해 크게 증가하였다(Fig. 2A). 또한 석회화 결정형성이 활발히 진행되었던 시기(9-10일째) 동안만 고농도 칼슘을 처리한 세포에서는 분화 전체 기간 고농도 세포의 칼슘을 처리한 경우보다 이들 유전자의 발현이 더 높게 나타났다. 배양 후기에 고농도 칼슘이 배양액에 존재한 이들 두 실험군에서 조골세포 후기 분화 표지인 OCN과 BSP의 발현은 대조군과 유사했지만, 조골세포 초기 분화 표지인 ALP와 Col1a1 유전자의 발현은 대조군에 비해 뚜렷하게 감소되었다. 그러나 석회화결절이 관찰되지 않은 8일까지만 고농도 칼슘을 처리하고 그 이후에는 정상 배지에서 키운 세포에서는 조사한 모든 유전자의 발현 수준이 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다. Ank, PC-1, OPN이 조골세포 분화 후기에 관찰되었기 때문에, 고농도 칼슘에 의한 Ank, PC-1, OPN 발현 증가가 조골세포 분화도와 무관하게 고농도 칼슘에 처리에 의해서도 유도되는지 확인하고자, 두개골 세포

를 분화배지에서 48시간 배양하면서 고농도 칼슘의 효과를 관찰하였다(Fig. 2B). 조골세포 후기 분화가 진행되지 않은 이런 세포에서는 고농도 칼슘에 의한 Ank, PC-1, OPN 발현증가가 나타나지 않았으며 ALP와 Col1a1의 발현에도 별다른 영향을 미치지 않았다. 결과는 보이지 않았지만, 분화배지에서 ascorbic acid를 제거하고 10일 동안 고농도 칼슘을 처리한 경우에도 Ank, PC-1, OPN 유전자 발현 증가는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 Ank, PC-1, OPN의 발현이 조골세포 분화도와 밀접히 연관되어 있으며, 고농도 세포의 칼슘이 단독으로 이들 유전자 발현을 조절하지는 못하는 것을 시사하였다. 기존의 연구에서 fibroblast growth factor 2(FGF2)가 MC3T3-E1 세포에서 PC-1과 Ank 발현을 증가시킨다는 보고된 바 있으나, 고농도 세포의 칼슘과는 달리 FGF2에 의한 효과는 주로 미분화된 상태에서 나타났으며 또한 FGF2가 미분화된 세포 및 조골세포 분화가 유도된 상태에서 모두 ALP 발현을 억제하여 결과적으로 석회화결절 형성을 억제하는 것으로 보고되었다(Hatch 등, 2005). 이러한 보고는 인위적인 유전자 과발현이 아니어도 국소성장인자에 의해 생리적으로 유도될 수 있는 PC-1, Ank 발현증가가 조골세포 석회화 억제에 직접 연관이 있을 수 있음을 시사하였기에 고농도 세포의 칼슘이 석회화에 미치는 효과를 확인할 필요가 있었다.

기존에 고농도 세포의 칼슘이 조골세포 분화를 촉진하고 석회화결절 형성을 증가시킨다는 보고에서는 MC3T3-E1 세포나 흰쥐 두개골 일차배양 세포를 사용하였고, 또 칼슘 농도도 이 연구에서 사용되는 농도보다 더 낮은 농도를 사용하였기 때문에, 이 연구에서 사용되는 배양 조건에서 석회화결절에 미치는 영향을 확인하였다. 세포 분

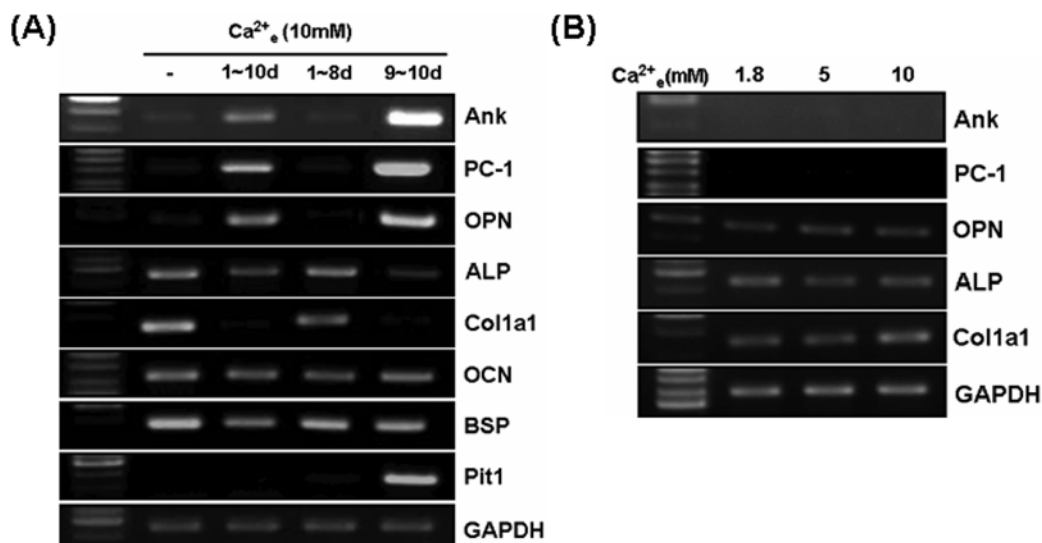


Fig. 2. Presence of high Ca^{2+} during the late period of osteoblast differentiation stimulated expression of Ank, PC-1 and OPN. (A) Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 10 days. In this culture condition, calcification of cellular nodules was not observed at day 8. High Ca^{2+} (10 mM) was treated for early period (1-8 days), for late period (9-10 days), or for the entire culture period (1-10 days). Gene expression was examined by RT-PCR. (B) Mouse calvarial cells were cultured with osteoblast differentiation medium for 2 days in the presence or the absence of high Ca^{2+} (5 or 10 mM) and gene expression was examined by RT-PCR.

화 상태를 현미경으로 계속 관찰하면서 세포 결절이 뚜렷하게 관찰되지만 석회화가 관찰되지 않은 시기를 기준으로 고농도 세포의 칼슘 처리시기를 구분하였다(Fig. 3A). von Kossa 염색 및 칼슘정량을 시행한 결과 석회화가 관찰되기 이전까지만 고농도 칼슘을 처리한 경우에는 대조군과 비교하여 석회화 결절 형성에 큰 차이가 없었지만, 석회화가 진행되는 동안 고농도 칼슘을 처리한 경우에는 석회화 정도가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3A). 분화 전체 기간 동안 고농도 칼슘을 처리한 경우에도 대조군에 비해 석회화 정도가 증가함이 관찰되어(Fig. 3B), 10 mM 정도로 높은 고농도 세포의 칼슘도 낮은 농도를 사용했던 기존의 보고와 유사하게 배양된 조골세포에 의한 석회화를 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Fig. 2A에서 고농도 칼슘이 조골세포 분화 후기에 존재하는 경우, 조골세포 후기분화 표지인자인 OCN이나 BSP 유전자의 발현에는 별 영향을 미치지 않았지만, 조골세포 초기분화 표지인자이며 골조직의 석회화에 필수적인 것으로 알려진(Fedde 등, 1999; Anderson 등, 2004; Murshed 등, 2005) ALP와 Col1a1 유전자의 발현이 감소

되었으며, 석회화 억제에 관여하는 Ank, PC-1, OPN 유전자의 발현이 증가되었음에도 불구하고 석회화는 더 촉진되는 것으로 나타났기 때문에, 고농도 칼슘에 의해 촉진된 기질 석회화가 혹시 배양액 중 고농도로 존재하는 칼슘이 세포의 기질에 무작위로 결합함으로써 나타난 가양성(false positive) 반응인지를 확인하고자 하였다. 배양액 중 ascorbic acid를 제거하여 정상적인 제1형 교원기질의 생성을 막아 조골세포 분화를 억제하고, β -glycerophosphate와 N-acetyl-L-cysteine을 포함한 배지에서 10일 동안 배양한 후 von Kossa 염색을 시행한 결과, 대조군, 실험군 모두에서 전혀 염색에 양성반응을 보이지 않았다(Fig. 3B). 또한 결과에 제시하지는 않았지만, 제1형 교원섬유를 배양접시에 깔고 분화 배지에 10일간 담근 후 von Kossa 염색을 시행하였을 때 고농도 칼슘 처리군에서 유의한 염색 증가가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 고농도 칼슘에 의한 석회화가 배양액 내 칼슘의 무작위적 침착일 가능성은 적으며, 적어도 조골세포 분화를 필요로 함을 시사하였다. 한편 조골세포 분화후기에 고농도 칼슘을 처리한 경우 ALP mRNA 발현이 감소되었으므로, 실제로 배양된 세포의 기질내 ALP

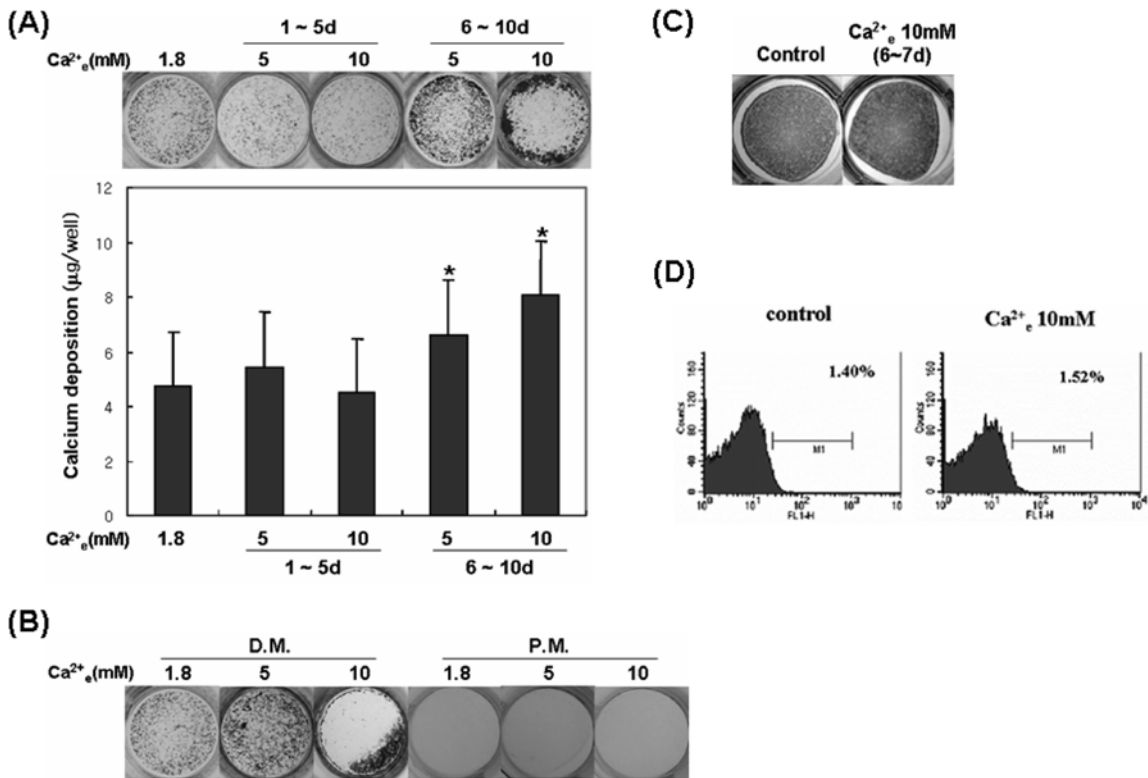


Fig. 3. High Ca²⁺_e increased matrix calcification by differentiated osteoblasts. (A) Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 10 days. High Ca²⁺_e was treated during the early (1-5 days) or the late stage (6-10 days) of osteoblast differentiation. Then, von Kossa's staining was performed (upper) or Ca²⁺ amount in calcified matrix was determined (lower). Data represent mean ± S.E. (N = 4). * significantly different from control, p < 0.01. (B) Cells were cultured for 10 days in osteoblast differentiation medium (D.M.) or in medium devoid of ascorbic acid (P.M.) as described in Materials and Methods. High Ca²⁺_e was treated for 10 days. Then, von Kossa's staining was performed. (C) Cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 7 days and ALP staining was performed. In high Ca²⁺_e group, 10 mM Ca²⁺_e treatment was performed for the last 48 hours. (D) Calvarial cells were cultured for 2 days in the presence or the absence of high Ca²⁺_e. Apoptotic cells were determined by flow cytometric analysis of annexin V-positive cells. Data represent the mean percentage of annexin V (+) cells (N = 4).

활성에 유의한 감소가 관찰되는지 확인하였다. 세포 결절이 충분히 만들어진 상태에서 고농도 칼슘을 48시간 처리하고 ALP 염색을 시행한 결과 대조군과 유의한 차이를 관찰할 수 없었으며 이는 석회화 결절 형성 초기에 ALP 활성이 잘 유지되고 있음을 시사하였다(Fig. 3C). 배양액에 첨가된 β -glycerophosphate는 석회화 초기에 ALP 활성에 의해 24시간 이내에 거의 대부분이 inorganic phosphate로 분해되며, 이로 인해 시작된 석회화가 이후 계속 진행되는데 있어서는 ALP 활성이 필요하지 않다는 기존의 보고를 고려하면(Bellows 등, 1991, 1992), 본 연구 시스템에서 고농도 칼슘이 조골세포 분화 후기에 ALP mRNA 발현을 억제하기는 하였지만 ALP 염색결과로 보아 이미 충분한 ALP 활성이 석회화초기에 존재하므로, 고농도 세포의 칼슘이 존재해도 석회화가 시작되는 시점에 충분한 ALP 활성을 유지할 수 있는 것으로 생각된다.

관절연골세포나 혈관 평활근세포처럼 정상적으로 석회화를 유도하지 않는 세포가 병적으로 석회화가 진행되는 데 세포사가 관련된다는 보고(Hashimoto 등, 1998; Proudfoot 등, 2000)와 inorganic phosphate 농도가 약간 증가된 상태에서 세포의 칼슘 농도가 높아지면 조골세포의 세포사가 촉진된다는 보고(Adams 등, 2001)가 있어, 고농도 세

포의 칼슘이 생쥐 두개골 세포의 세포사를 유도하는지 확인하였다. Fig. 3D에서 보여주는 바와 같이 고농도 세포의 칼슘을 48시간 처리한 경우 대조군과 비교하여 세포사 정도에 별다른 차이를 보이지 않았다. 이는 고농도 칼슘에 의한 석회화 촉진효과가 세포사로 인한 병적 석회질 침착은 아닐 가능성이 높음을 시사하였다.

관절 연골의 경우 PC-1 및 Ank의 발현이 높아져 세포의 기질의 pyrophosphate 농도가 높아지면 calcium pyrophosphate dihydrate(CPPD) 결정이 과잉 침착되어 관절 연골의 석회화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Terkeltaub, 2001; Johnson과 Terkeltaub, 2004). 결과를 제시하지는 않았지만 본 연구 시스템에서 조골세포 분화후기에 고농도 칼슘을 처리한 경우 연골세포의 후기분화 표지인자인 type X collagen, aggrecan, matrix metalloproteinase-13 mRNA의 발현 증가가 확인되었기 때문에, 혹시 고농도 칼슘이 Ank과 PC-1 mRNA 발현증가를 통해 pyrophosphate 농도를 높여 CPPD 침착을 유도했을 가능성이 있는지 확인하고자 하였다. 먼저 hydroxyapatite 결정 형성에 필요한 inorganic phosphate를 제공하는 데 ALP 활성을 필요로 하지 않는 sodium phosphate를 β -glycerophosphate 대신 직접 분화배지에 첨가해준 경우, 고농도 칼슘에 의한 석회화 촉진 효과는 여

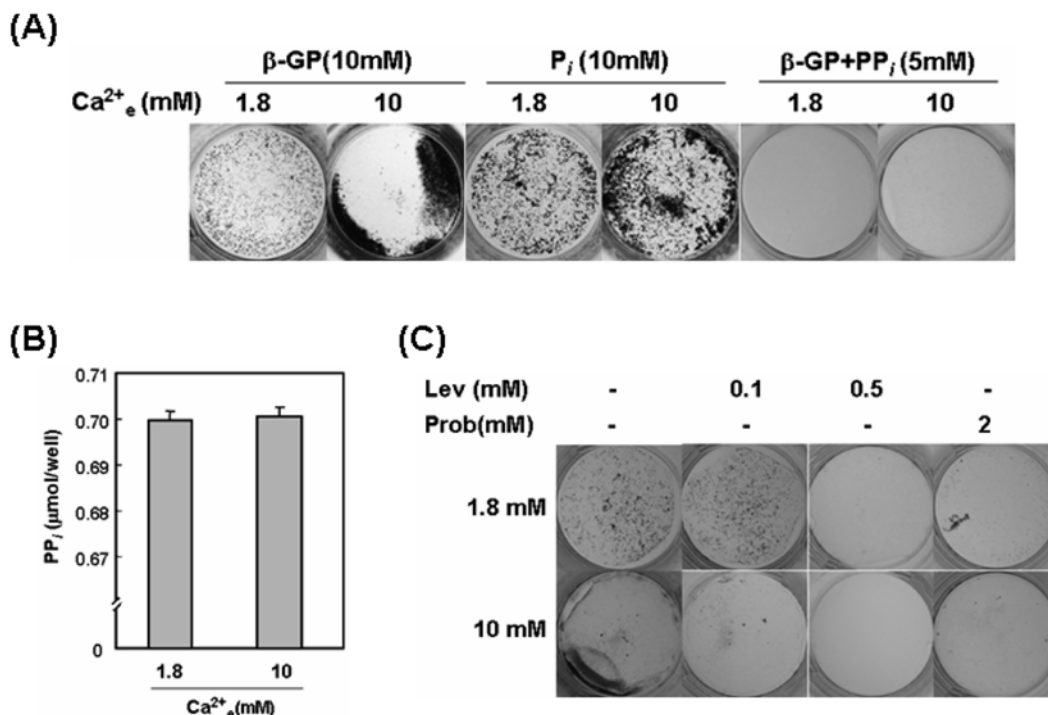


Fig. 4. High Ca²⁺-induced matrix calcification is more susceptible to ALP inhibition than control. (A) Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 10 days (β -GP) and high Ca²⁺ was treated for the last 3 days. P_i, Sodium phosphate (10 mM) was used as a source of inorganic phosphate instead of 10 mM β -glycerophosphate; β -GP+PP_i, Pyrophosphate (5 mM) was added to culture medium containing 10 mM β -glycerophosphate for the last 3 days. (B) Cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 12 days. High Ca²⁺ was treated for the last 4 days. Culture medium was changed every other day. At the end of culture, pyrophosphate amount in culture medium was determined as described in Materials and Method. Data represent mean \pm S.E. (N = 4). (C) Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 10 days and high Ca²⁺ was treated for the last 3 days. Levamisole (Lev) or probenecid (Prob) of indicated concentration was added to culture medium 30 minutes before high Ca²⁺ treatment. At the end of culture, von Kossa's staining was performed.

전히 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 4A). 이는 고농도 inorganic phosphate 첨가를 통해 pyrophosphate와 inorganic phosphate 간 균형을 inorganic phosphate 쪽으로 맞추어도 고농도 칼슘의 석회화 촉진효과가 나타남을 시사하므로, 고농도 칼슘에 의한 석회화가 CPPD가 아닐 가능성을 시사하였다. 고농도 inorganic phosphate 첨가와는 반대로 β -glycerophosphate와 더불어 pyrophosphate를 5 mM 농도로 추가하여 pyrophosphate와 inorganic phosphate간 균형을 pyrophosphate 쪽으로 기울였을 경우에는 대조군과 고농도 칼슘군 모두에서 석회화가 완전히 억제되는 결과를 보였다(Fig. 4A). 이는 고농도 세포의 칼슘 존재 하에 pyrophosphate 농도를 높이는 경우에도 석회화가 일어나지 않음을 보여주는 것이므로 고농도 칼슘에 의한 석회화 촉진효과가 CPPD 침착에 의한 것이 아닐 것을 시사하는 것이라 생각되었다. 고농도 칼슘 처리에 의해 실제 배양액내 pyrophosphate 양의 유의한 변화가 나타나는지 확인하기 위해, 석회화가 진행 중인 시기에 고농도 칼슘을 처리한 후 배양액내 pyrophosphate 양을 측정된 결과 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4B). 고농도 세포의 칼슘의 처리로 Ank, PC-1 mRNA 발현 증가는 확인하였지만 단백질 수준에서는 확인하지 않았으므로 실제 단백질 수준에서 발현 증가정도가 아주 미약했을 가능성을 배제할 수는 없지만, 배양 내 ALP 활성이 높은 상태이므로, 증가된 pyrophosphate가 ALP 활성에 의해 이미 inorganic phosphate로 전환되었을 가능성도 있을 것으로 생각되었다. 이와 관련하여 고농도 칼슘 처리 30분전부터 levamisole을 이용하여 ALP의 활성을 억제한 실험에서, 0.5 mM 농도로 levamisole를 첨가한 경우 대조군과 고농도 칼슘군 모두 석회화가 거의 억제되었으나, 0.1 mM levamisole을 첨가한 경우에는 대조군의 석회화는 뚜렷한 억제효과가 나타나지 않은 반면 고농도 칼슘에 의한 석회화는 크게 억제됨을 보였다(Fig. 4C). 이러한 결과는 고농도 칼슘에 의해 실제로 pyrophosphate가 증가하나, ALP 활성이 높은 상태에서는 inorganic phosphate로 쉽게 전환되지만 낮은 농도의 levamisole에 의해 ALP 활성이 부분적으로 저해되면 pyrophosphate의 inorganic phosphate로의 전환이 상대적으로 감소하여 결과적으로 석회화 저해효과가 더 쉽게 나타났을 가능성을 시사하는 것으로 생각되었다. 또한 probenecid를 첨가하여 Ank의 활성을 저해한 경우 대조군과 고농도 칼슘군 모두 석회화가 거의 억제된 결과는 조골세포 분화 후기에 Ank 발현 증가를 통해 pyrophosphate 생성 및 분비를 유도하는 것이 정상적 석회화의 진행에 필요할 수 있음을 시사하였다(Fig. 4C).

Inorganic phosphate가 조골세포의 분화와 석회화를 촉진하는 효과를 나타내기 위해서는 세포 외부에 고농도로 존재하는 inorganic phosphate가 세포 내부로 들어가는 과정을 필요로 하는 것으로 알려져 있다(Beck 등, 2003;

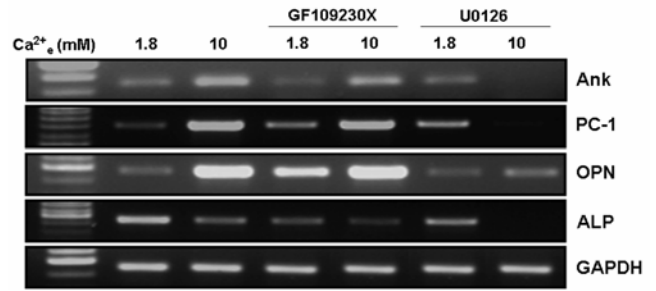


Fig. 5. p44/42 MAPK pathway is involved in high Ca^{2+} -induced expression of Ank, PC-1 and OPN. Mouse calvarial cells were cultured in osteoblast differentiation medium for 10 days and high Ca^{2+} was treated for the last 48 hours. GF109230X (1 mM) or U0126 (20 mM) was added to culture medium 30 minutes before high Ca^{2+} treatment. At the end of culture, RT-PCR was performed.

Suzuki 등, 2006). Pit-1은 inorganic phosphate를 세포 내로 수송하는 수송체 중 하나로 조골세포에서 발현이 확인되었으며, Pit-1 mRNA 발현을 저해하거나 foscarnet 처리를 통해 Pit-1의 기능을 억제하면 bone morphogenetic protein-2에 의해 유도되는 석회화 결절형성이 유의하게 감소됨이 보고되었다(Nielsen 등, 2001; Suzuki 등, 2006). 본 연구 시스템에서 석회화결절 형성 기간 동안만 고농도 세포의 칼슘이 존재하는 경우 대조군에 비해 Pit-1 mRNA의 발현이 높게 유도됨이 관찰되었으며(Fig. 2A), 이러한 효과도 고농도 칼슘에 의한 석회화 촉진에 관여할 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

마지막으로 고농도 칼슘에 의한 Ank, PC-1, OPN의 발현조절에 관여하는 신호전달과정을 알아보려고 하였다. 기존의 보고들에 따르면, 조골세포에서 고농도 세포의 칼슘에 의한 세포 증식, 이동, 분화, RANKL 발현 촉진 효과에 세포내 칼슘 증가, PKC, phosphoinositide 3-kinase, p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등이 관여하고(Godwin과 Soltoff, 1997; Yamaguchi 등, 2000; Kim 등, 2003; Dvorak 등, 2004), FGF2에 의한 Ank, PC-1 발현증가에 PKC와 p44/42 MAPK가 관여한다고 하였으므로(Hatch 등, 2005), PKC 저해제인 GF109230X와 MEK1/2 활성저해를 통해 p44/42 MAPK 활성화를 막는 U0126을 전처리하고 고농도 세포의 칼슘의 효과를 관찰하였다. 그 결과 고농도 칼슘에 의한 Ank, PC-1, OPN 발현 촉진효과는 U0126 전처리에 의해 완전히 억제되었으나 PKC 저해제는 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). 그러나 고농도 칼슘에 의한 ALP 발현 억제효과는 U0126에 의해 회복되지 않고 오히려 발현이 더 크게 억제되어 고농도 칼슘에 의한 ALP 발현 조절에는 또 다른 경로가 관여할 것을 시사하였다. FGF2나 고농도 칼슘에 의한 Ank, PC-1 발현 촉진에 모두 공통적으로 p44/42 MAPK 활성화를 필요로 하는 것으로 나타나, 이들 유전자 발현에 MEK1/2-p44/42 MAPK 경로가 관여할 것으로 생각되었다.

Pyrophosphate가 hydroxyapatite 결정 성장에 저해제로 작용함에도 불구하고, Ank, PC-1과 같이 pyrophosphate 생산 및 분비를 높이는 유전자가 정상적인 조골세포 분화과정 중 발현이 증가하는 이유는 아직 명확하지 않다. 이의 생리적 기능에 대해 두 가지 가능성이 있을 것으로 생각된다. 한 가지 가능성은 기존의 일부 보고에서 언급된 것처럼(Anderson 등, 2004, 2005) 석회화가 왕성히 진행될 초기에 발현이 증가된 Ank와 PC-1의 활성을 통해 pyrophosphate가 만들어지면 조골세포에서 이미 높게 발현된 ALP 활성을 통해 inorganic phosphate로 전환되어 hydroxyapatite 결정을 만드는 재료로 사용되는 것이다. 기존의 보고에 따르면 MC3T3-E1 세포의 분화배지에 β -glycerophosphate 대신 pyrophosphate를 넣어주어도 정상적인 석회화결절 형성이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Addison 등, 2007). 또한 PC-1 유전자가 결핍된 생쥐에 ALP 유전자도 동시에 결핍시켜 inorganic phosphate와 pyrophosphate간 균형을 맞추어 주면 연골이나 인대의 과석회화는 개선되지만 일부 장골(long bone)의 골연화증은 지속된다는 보고(Anderson 등, 2005), 생체 내에서 정상적인 석회화의 유도에 관여하는 비대연골세포(hypertrophic chondrocyte)의 분화 유도 시 증가하는 Ank의 발현을 siRNA를 이용해 저해하거나 probenecid 처리를 통해 기능을 저해하면 정상적 석회화가 이루어지지 않는다는 보고(Wang 등, 2005), 그리고 석회화가 진행될 때 만들어지는 기질 소포에 ALP와 더불어 PC-1이 같이 농축된다는 보고(Johnson 등, 1999b)들은 이러한 가능성을 뒷받침하는 것으로 생각된다. 이와 관련하여 본 연구에서 Ank의 저해제로 사용되는 probenecid를 석회화가 진행되는 기간 동안 배양에 첨가하면 대조군과 고농도 칼슘에 의한 석회화를 모두 억제한다는 결과도 이러한 가능성을 지지하는 결과로 생각된다. 다른 한 가지 가능성은 조골세포에 의한 세포의 기질의 과도한 석회화를 막는 음성되먹임 기전으로 작용할 가능성이 있다. 특히 조골세포가 생성된 기질에 파묻히게 되면 골세포가 되며, 골세포가 위치하는 lacuna 내부에는 골세포와 lacuna 벽 사이에 석회화가 진행되지 않은 공간이 존재한다. 골조직에서 OPN 발현이 가장 높게 나타나는 세포는 골세포이고(Zhu 등, 2001), 골세포는 조골세포에 비해 ALP 발현 정도가 낮으며(Aubin과 Liu, 1996), OPN이 석회화 억제 기능을 나타내기 위해서는 인산화가 되어있어야 하고 ALP를 처리하여 탈인산화를 유도하면 석회화 억제 기능이 감소된다는(Jono 등, 2000) 기존의 보고와 더불어 Ank, PC-1의 발현이 조골세포 분화 후기로 갈수록 증가한다는 본 연구결과를 고려하면, 골세포 주변에는 inorganic phosphate와 pyrophosphate간 균형이 pyrophosphate쪽으로 기울고 또 석회화 억제 기능이 잘 나타나는 인산화된 OPN의 침착이 증가하여 lacuna 내부의 석회화를 억제할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 이상의 연구결과를 종합하면, 생쥐 두개골 세포가 조골세

포로 분화하는 과정에서 조골세포 분화 후기에 Ank, PC-1, OPN의 발현이 증가하였고, 고농도 세포의 칼슘은 조골세포에 의한 기질 석회화를 촉진하는 효과를 보였으며, 조골세포 분화 후기에 고농도 세포의 칼슘이 존재하는 경우 Ank, PC-1, OPN 유전자의 발현이 크게 증가되었고 이 과정에 p44/42 MAPK 활성화가 관여함이 확인되었다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

- Adams, C.S., Mansfield, K., Perlot, R.L. and Shapiro, I.M.: Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J. Biol. Chem.* **276**:20316-20322, 2001.
- Addison, W.N., Azari, F., Srensen, E.S., Kaartinen, M.T. and McKee, M.D.: Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* **282**:15872-15883, 2007.
- Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hesse, L., Dhanyamraju, R., Atti, E., Camacho, N.P. and Milln, J.L.: Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **164**:841-847, 2004.
- Anderson, H.C., Harmey, D., Camacho, N.P., Garimella, R., Sipe, J.B., Tague, S., Bi, X., Johnson, K., Terkeltaub, R. and Milln, J.L.: Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **166**:1711-1720, 2005.
- Aubin, J.E. and Liu, F.: The osteoblast lineage. In *Principles of Bone Biology*, 1st ed., pp51-67, Academic Press, San Diego, 1996.
- Beck, G.R. Jr.: Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **90**:234-243, 2003.
- Beck, G.R. Jr., Moran, E. and Knecht, N.: Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp. Cell Res.* **288**:288-300, 2003.
- Bellows, C.G., Aubin, J.E. and Heersche, J.N.: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* **14**:27-40, 1991.
- Bellows, C.G., Heersche, J.N. and Aubin, J.E.: Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.* **17**:15-29, 1992.
- Brown, E.M. and MacLeod, R.J.: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**:239-297, 2001.
- Dvorak, M.M. and Riccardi, D.: Ca^{2+} as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* **35**:249-255, 2004.

- Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, D.T., Carter, D.H., Dallas, S.L., Nemeth, E.F. and Riccardi, D.: Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:5140-5145, 2004.
- Fedde, K.N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S.P., Ryan, L.M., Weinstein, R.S., Waymire, K., Narisawa, S., Milln, J.L., MacGregor, G.R. and Whyte, M.P.: Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* **14**:2015-2026, 1999.
- Godwin, S.L. and Soltoff, S.P.: Extracellular calcium and platelet derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **272**:11307-11312, 1997.
- Hakim, F.T., Cranley, R., Brown, K.S., Eanes, E.D., Harnes, L. and Oppenheim, J.J.: Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy. *Arthritis Rheum.* **27**:1411-1420, 1994.
- Harmey, D., Hessle, L., Narisawa, S., Johnson, K.A., Terkeltaub, R. and Milln, J.L.: Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am. J. Pathol.* **164**:1199-1209, 2004.
- Harmey, D., Johnson, K.A., Zelken, J., Camacho, N.P., Hoylaerts, M.F., Noda, M., Terkeltaub, R. and Milln, J.L.: Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in *Akp2(-/-)* mice. *J. Bone Miner. Res.* **21**:1377-1386, 2006.
- Hashimoto, S., Ochs, R.L., Rosen, F., Quach, J., McCabe, G., Solan, J., Seegmiller, J.E., Terkeltaub, R. and Lotz, M.: Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:3094-3099, 1998.
- Hatch, N.E., Nociti, F., Swanson, E., Bothwell, M. and Somerman, M.: FGF2 alters expression of the pyrophosphate/phosphate regulating proteins, PC-1, ANK and TNAP, in the calvarial osteoblastic cell line, MC3T3E1(C4). *Connect. Tissue Res.* **46**:184-192, 2005.
- Hessle, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R. and Millan, J.L.: Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:9445-9449, 2002.
- Ho, A.M., Johnson, M.D. and Kingsley, D.M.: Role of mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* **289**:265-269, 2000.
- Hunter, G.K., Kyle, C.L. and Goldberg, H.A.: Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins; structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* **300**:723-728, 1994.
- Johnson, K. and Terkeltaub, R.: Upregulated *ank* expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPI excess. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:321-335, 2004.
- Johnson, K., Vaingankar, S., Chen, Y., Moffa, A., Goldring, M., Sano, K., Jin-Hua, P., Sali, A., Goding, J. and Terkeltaub, R.: Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **42**:1986-1997, 1999a.
- Johnson, K., Moffa, A., Chen, Y., Pritzker, K., Goding, J. and Terkeltaub, R.: Matrix vesicle plasma membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J. Bone Miner. Res.* **14**:883-892, 1999b.
- Johnson, K.A., Hessle, L., Vaingankar, S., Wennberg, C., Mauro, S., Narisawa, S., Goding, J.W., Sano, K., Millan, J.L. and Terkeltaub, R.: Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**:R1365-R1377, 2000.
- Johnson, K., Goding, J., Van Etten, D., Sali, A., Hu, S.I., Farley, D., Krug, H., Hessle, L., Milln, J.L. and Terkeltaub, R.: Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J. Bone Miner. Res.* **18**:994-1004, 2003.
- Jono, S., Peinado, C. and Giachelli, C.M.: Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J. Biol. Chem.* **275**:20197-20203, 2000.
- Jun, J.H., Lee, S.H., Kwak, H.B., Lee, Z.H., Seo, S.B., Woo, K.M., Ryoo, H.M., Kim, G.S. and Baek, J.H.: N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J. Cell. Biochem.* **103**:1246-1255, 2007.
- Kim, H.K., Song, M., Jun, J.H., Woo, K.M., Kim, G.S. and Baek, J.H.: Identification of genes modulated by high extracellular calcium in coculture of mouse osteoblasts and bone marrow cells by oligo chip assay. *Int. J. Oral Biol.* **31**:53-65, 2006.
- 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- κ B ligand induction by high extracellular calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:729-735, 2003.
- Lynch, M.P., Capparelli, C., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B.: Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J. Cell. Biochem.* **68**:31-49, 1998.
- Murshed, M., Dymna, H., Jos, L.M., Marc, D.M. and Gerard, K.: Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* **19**:1093-1104, 2005.
- Nielsen, L.B., Pedersen, F.S. and Pedersen, L.: Expression of type III sodium-dependent phosphate transporters/retroviral receptors mRNAs during osteoblast differentiation. *Bone* **28**:160-166, 2001.
- Okawa, A., Nakamura, I., Goto, S., Moriya, H., Nakamura, Y. and Ikegawa, S.: Mutation in *Npps* in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* **19**:271-273, 1998.
- Proudfoot, D., Skepper, J.N., Hegyi, L., Bennett, M.R., Shanahan, C.M. and Weissberg, P.L.: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ. Res.* **87**:1055-1062, 2000.
- Rutsch, F., Vaingankar, S., Johnson, K., Goldfine, I., Maddux, B., Schauerte, P., Kalhoff, H., Sano, K., Boisvert, W.A., Supert-Furga, A. and Terkeltaub, R.: PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile

- arterial calcification. *Am. J. Pathol.* **158**:543-554, 2001.
- Rutsch, F., Ruf, N., Vaingankar, S., Toliat, M.R., Suk, A., Hhne, W., Schauer, G., Lehmann, M., Roscioli, T., Schnabel, D., Epplen, J.T., Knisely, A., Superti-Furga, A., McGill, J., Filippone, M., Sinaiko, A.R., Vallance, H., Hinrichs, B., Smith, W., Ferre, M., Terkeltaub, R. and Nrnberg, P.: Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat. Genet.* **34**:379-381, 2003.
- Silver, I.A., Murrills, R.J. and Etherington, D.J.: Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **175**:266-276, 1988.
- Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Frenkel, B. and Montecino, M.: Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In *Principles of Bone Biology*, 1st ed., pp69-86, Academic Press, San Diego, 1996.
- Suzuki, A., Ghayor, C., Guicheux, J., Magne, D., Quillard, S., Kakita, A., Ono, Y., Miura, Y., Oiso, Y., Itoh, M. and Caverzasio, J.: Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **21**:674-683, 2006.
- Terkeltaub, R.A.: Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**:C1-C11, 2001.
- Wang, W., Xu, J., Du, B. and Kirsch, T.: Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization. *Mol. Cell. Biol.* **25**:312-323, 2005.
- Whyte, M.P.: Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr. Rev.* **15**:439-461, 1994.
- Yamaguchi, T., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Sanders, J.L. and Brown, E.M.: Activation of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases by extracellular calcium-sensing receptor agonists induces mitogenic responses in the mouse osteoblastic MC3T3-E1 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**:363-368, 2000.
- Yamauchi, M., Yamaguchi, T., Kaji, H., Sugimoto, T. and Chihara, K.: Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**:E608-E616, 2005.
- Zhu, J.X., Sasano, Y., Takahashi, I., Mizoguchi, I. and Kagayama, M.: Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem. J.* **33**:25-35, 2001.