



RIP function on osteoclastogenesis

Junwon Lee*

Department of Biomedical Science & Biotechnology, Paichai University

ABSTRACT

Bone is continuously remodeled by osteoblasts and osteoclasts. Proper balance between bone matrix formation by osteoblasts and resorption by osteoclasts is essential for proper bone metabolism and these processes are tightly regulated by various hormones and cytokines in local microenvironments. Osteoclasts are multinucleated cells that form only in bone and specialize in the resorption of calcified matrix. Osteoclasts were derive from hematopoietic cells in the bone marrow and stimulated by receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand (TRANCE, RANKL). RIP is known as a potent therapeutic agent with anti-inflammatory by activation of T cell potential. However, the regulatory effects of RIP on osteoclast differentiation are unclear. In this study, We examined the effects of RIP on osteoclast differentiation with respect to bone resorption. RIP negatively regulates TRANCE-induced osteoclast differentiation. Expression levels of RIP are significantly reduced by TRANCE during osteoclastogenesis. Overexpression of RIP in bone marrow-derived monocyte/macrophage lineage cells (BMMs) inhibits the formation of TRAP multinuclear osteoclasts. Furthermore, overexpression of RIP in BMMs attenuates the gene induction of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 and osteoclast-associated receptor (OSCAR) during TRANCE-mediated osteoclastogenesis. Taken together, our results suggest that RIP can act as an important modulator of TRANCE-mediated osteoclastogenesis.

© 2015 KKITS All rights reserved

KEYWORDS : Osteoporosis, Osteoclasts, Inhibitory activities, RIP, TRAP

ARTICLE INFO: Received 16 August 2015, Revised 8 October 2015, Accepted 8 October 2015.

*Corresponding author is with the Department of Biomedical Science & Biotechnology, Paichai University, Daejeon, Korea, 302-735, KOREA
E-mail address: junwon@pcu.ac.kr

1. 서론

뼈는 신체내에서 계속해서 리모델링이 이루어지

는 매우 동적인 상태를 유지하고 있는데, 뼈를 만드는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclast)의 균형 속에서 이루어진다. 그러나 이들 사이의 균형이 깨지면 골질환을 유발하게 되는데, 특히 파골세포의 활성화는 뼈를 약화시키며 이는 많은 대사성 골질환과 밀접한 관계가 있으며 [1], 대표적인 골소실 질환 중의 하나인 골다공증(osteoporosis)은 폐경 및 노화에 따른 성 호르몬의 변화로 파골세포의 활성이 높아져 정상적인 뼈의 리모델링 과정이 깨지게 되어 발병하게 되며, 파골세포의 활성화에 의해 일어나는 질병이다[2].

파골세포는 골수계(myeloid lineage)의 조혈모(hematopoietic precursors)로부터 분화되어 골흡수를 담당하는 중요한 골세포이다. 파골세포의 분화는 조골세포에서 제공되는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 tumor necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine (TRANCE/RANKL)에 의해 유도되며 이 물질들은 파골세포의 분화에 있어서 필수적이며 관련된 신호전달체계에 대한 연구는 매우 중요하다고 여겨지고 있다[3]. 또한, osteoprotegerin ligand (OPGL) 등의 영향에 따라 대식세포에서 파골세포의 활성을 조절해준다[4].

TRANCE(RANKL)는 수용체인 RANK에 지속적인 결합으로 인해 mitogen-activated protein kinase(MAPK), NF- κ B, microphthalmia transcription factor (MITF), PU-1 그리고 nuclear factor of activated T cells c1(NFATc1) 등의 세포 내 다양한 신호전달 단백질의 활성을 촉진하고 발현시킨다[5, 6].

1995년에 처음 발견된 RIP(receptor interacting protein)은 세포 내 스트레스 (예; 병원성감염, 염증반응)에 대한 필수적인 센서 단백질이다. 7개의 subfamily가 있는데 이들은 모두 N 말단에 kinase domain을 갖고 있고 서로 다른 recruitment

domain을 갖고 있다[7].

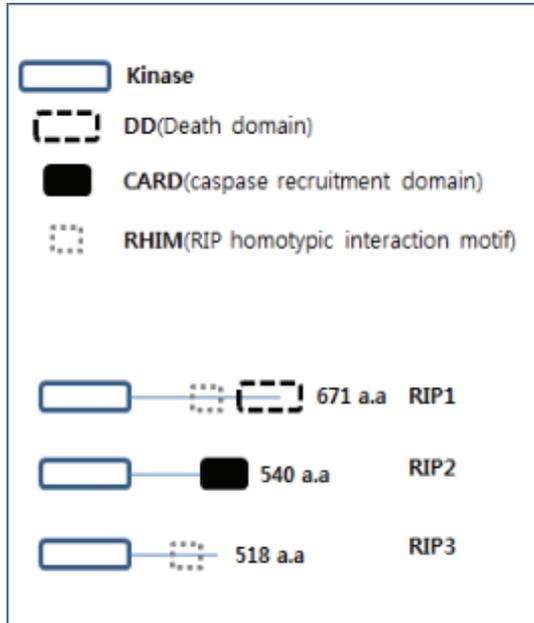


그림 1. RIP kinases의 도메인 구성
Figure 1. Domain organization of the RIP kinases

TNF(tumor necrosis factor)에 의해 발생하는 신호전달의 중요인자로 알려진 RIP1은 많은 조직에서 발현되고 있으며 T 세포의 활성, TNF 자극 후에 발현 유도된다고 보고되었으며, death domain(DD) kinase로 TNF 자극에 의해 NF- κ B 활성화에 관여하고 세포사멸을 촉진한다고 알려져 있다[8]. RIP2는 염증반응(TLR, Nod pathway)과 T 세포 성장에 필요하고 선천성 면역반응과 후천성 면역반응에 관여한다고 알려져 있다[9]. RIP2를 과발현 시키면 NF- κ B, MAPK 활성이 증가한다고 알려져 있다 [10]. RIP3는 RIP1, TRAF2와 결합한다고 알려져 있는데 이는 RIP3가 TNFR1 신호전달 복합체의 일부 분이라는 것을 제안하고 있다. RIP3는 RIP1을 인산화 시키는데 그 결과로 TNF에 의해 유도된 NF- κ B 활성이 감소된다고 한다. TNF α 에 의해 유도된

세포사멸에 관여하기도 하며, NF- κ B 활성을 증가시키기도 하고 억제하기도 하여 논의의 여지를 보이고 있다. TNF 신호전달에서 RIP3의 기능은 아직 명확히 밝혀지지 않았다[11].

이 논문에서는 RIP kinase 발현조절을 통해 파골세포 분화와 기능에 미치는 영향을 알아보고, TRANCE/RANKL과 TNF α 에 의해 유도되는 파골세포 분화에서 RIP의 역할을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

파골세포의 분화에 사용되는 배지는 α -MEM(α -Minimal essential medium, Gibco), penicillin-streptomycin solution (5000 units/ml penicillin; 50000 μ g/ml streptomycin). FBS(fetal bovine serum)이며, 세포의 염색에 이용되는 staining solution은 Naphthol AS-MX, Fast red violet LB salt (SIGMA-Aldrich)을 사용하였다.

2.2 마우스 골수세포로부터 파골전구세포의 분리

골수세포는 7주령의 ICR 마우스를 이용하여 경추탈골법을 진행한 후 femur와 tibia를 각각 분리하여 얻었다. 분리된 femur와 tibia의 각 끝을 잘라 1% α -MEM으로 통과시켜 골수세포를 모았다.

파골전구세포를 얻기 위해 골수세포에 10% FBS와 1% penicillin/ streptomycin이 첨가된 10% α -MEM 배지에 40ng/ml M-CSF를 분주하여 cell culture dish에 72시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양해준다. 배양된 세포는 파골전구세포로서의 BMMs을 사용하였다.

2.3 TRAP assay and multinucleated osteoclast counting

ICR 마우스에서 bone marrow cell을 얻어서 MEM alpha 배지에서 3일 동안 M-CSF(60ng/ml) 첨가 후 배양한다. 72시간 동안 culture dish에 부착하여 배양된 세포를 DPBS buffer로 washing 한 후 cell dissociation solution으로 세포를 떼어 준다. 얻어진 bone marrow macrophages(BMM)를 cell counting 하여 40ng/ml M-CSF과 150ng/ml TRANCE를 96-well plate에 well 당 1.5x10⁵ cell/well로 72시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 대조군은(positive control, P.C) M-CSF와 TRANCE만을 첨가하였고, M-CSF, TRANCE, sample을 첨가하여 실험군으로 나누어 진행하였다. 72시간 후 파골세포 분화 시 특이적으로 발현하는 효소인 TRAP을 이용하여 pNPP(Para-Nitrophenyl phosphate)기질을 넣어주어 Optical Density(O.D) 450nm에서 측정하였다.

BMMs(1.5x10⁵cell/well) 배양으로 얻은 다핵형파골세포를 10% formalin으로 15분 동안 고정한 다음 washing buffer로 formalin을 깨끗이 세척한 후 staining용액을 150ul 분주한 후 15~30분 동안 빛이 없는 어두운 곳에서 반응시켜준다. 염색이 되면 3차 증류수로 세척을 한 후 물기를 제거하기 위해 96well plate 뚜껑을 살짝 열어둔 다음 24시간 후 붉은색으로 염색된 세포를 현미경 100배율로 촬영하고 집계하여 다핵형 파골세포의 수를 계수하였다.

2.4 RT-PCR assay

BMMs을 6well plate에 3x10⁵cell/well로 40ng/ml M-CSF, 150ng/ml RANKL과 Sample 농도별로 각각 분주하여 trizol (invitrogen)이용해 총 RNA를 분리

하였다. 분리한 RNA의 2ug을 이용하여 cDNA (RevertAid First Dtrand cDNA Synthesis Kit, Thermo)로 합성하였다. 합성된 cDNA를 PCR(Polymerase chain reaction)을 진행하였으며, PCR 후 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel 상에서 관찰하였다. PCR에 사용된 primer는 housekeeping gene인 GAPDH를 사용하였고, 파골세포 분화의 지표로 사용된 OSCAR, TRAP, NFATc1을 비교하여 상대적 발현을 비교하였다.

이 실험에 사용된 primer의 서열은 다음과 같다.

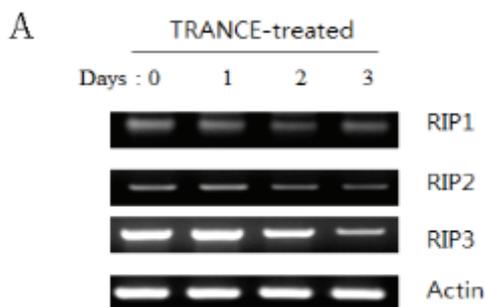
표 1. 프라이머 서열
Table 1. Primer sequence

프라이머	서열
5-mRIP1	ACC CCA AAT CTA AGC CAA ATG
3-mRIP1	TCA TCA GTC AGA CTA GTG GTG
5-mRIP2	ACC CAT TGT GAG CCA GAT GAC
3-mRIP2	GAA GAG CAG TCT TGA GGT GCT
5-mRIP3	ACC ACA GAA ATG GAT TGC CCG
3-mRIP3	TAA AGT ATG TGG AAT CTG AGG
5-NFATc1	CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC
3-NFATc1	CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG
5-OSCAR	CTG CTG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA
3-OSCAR	CCA AGG AGC CAG AAC CTT CGA AAC
5-TRAP	CAG TTG GCA GCA GCC AAG GAG GAC
3-TRAP	GTC CCT CAG GAG TCT AGG TAT CAC
5-GAPDH	TGA CCA CAG TCC ATG CCA TCA CTG
3-GAPDH	CAG GAG ACA ACC TGG TCC TCA GTG

3. 실험결과

3.1 파골세포 분화 시 RIP의 발현패턴분석

BMM에 M-CSF(60ng/ml)과 TRANCE(RANKL 120ng/ml) 또는 TNF- α 첨가 후 3일 동안 배양한다. RIP의 발현패턴을 보기 위해 파골세포 분화 유도 시 24시간 마다 세포 회수하여 trizol(invitrogen)을 이용하여 total RNA 분리하였다. cDNA를 합성하여 RT-PCR 결과 RIP1, 2, 3, 파골세포에서 발현되고, 분화 진행되는 동안 발현이 줄어드는 것을 확인했다<그림 2>. 이 결과 RIP family 들은 TRANCE 첨가한 파골세포 배양에서 유전자 발현이 감소하여 파골세포의 분화를 저해한다고 추측할 수 있다. RIP은 평상시에 파골세포의 성장에 관여하지만 TRANCE에 의해 osteoclastgenesis가 유도될 때 TRANCE에 의해 유도되는 신호전달계중 알려지지 않은 메카니즘에 의해 RIP의 발현이 저해된다고 가정할 수 있다. 그러나, 지금까지 알려진 연구 결과들과 동일하게 TNF- α 처리한 파골세포에서는 RIPs의 발현은 증가하고 있다(그림 1B). 또한, 파골세포의 분화를 진행시킨다고 알려진 OSCAR, NFATc1 gene와 분화 marker인 TRAP은 TRANCE 유도시에 발현이 증가하고 있으나 파골세포의 분화를 시작하는데 작용하는 것으로 알려진 TNF- α 를 처리하면 OSCAR와 NFATc1의 발현 양상은 TRANCE와 다른 양상을 보여주고 있다<그림 1C>.



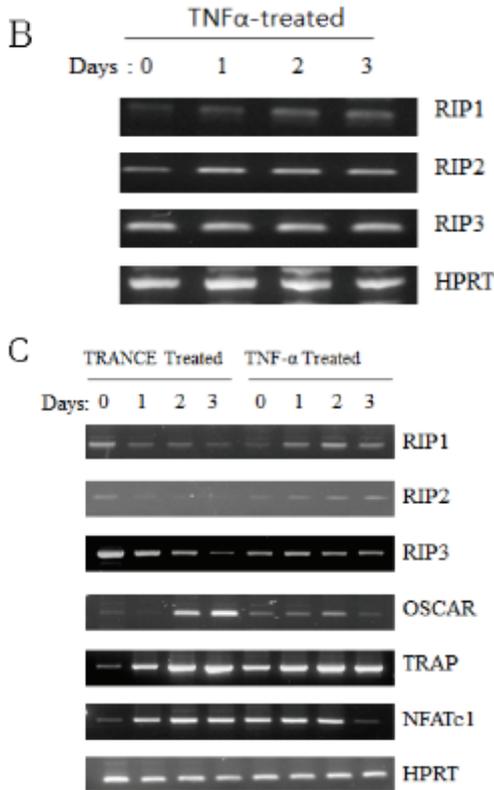


그림 2. 파골세포 분화시 유전자 발현의 관찰

- a) TRANCE 유도 파골세포 분화시 RIP 발현
- b) TNF α 유도 파골세포 분화시 RIP 발현
- c) RIP과 파골세포분화 유전자의 발현

Figure 2. Observation of gene expression during osteoclastogenesis.

- a) RIP expression during TRANCE-induced osteoclastogenesis
- b) RIP expression during TNF α-induced osteoclastogenesis
- c) RIP and osteoclastogenic gene expression

3.2 RIP 발현조절에 따른 파골세포 분화 확인

BMM에서 획득한 RNA로부터 cDNA를 만들어서 RIP1, 2, 3을 각각 PMX-IRES-EGFP vector에 클로닝하고, Plat-E cell(retroviral packaging cell line)에 transfection하여 48시간 후에 바이러스 supernatant를 회수하여 여과한 후 polybrane 첨가하여 BMM에 6시간 동안 infection 시킨다.

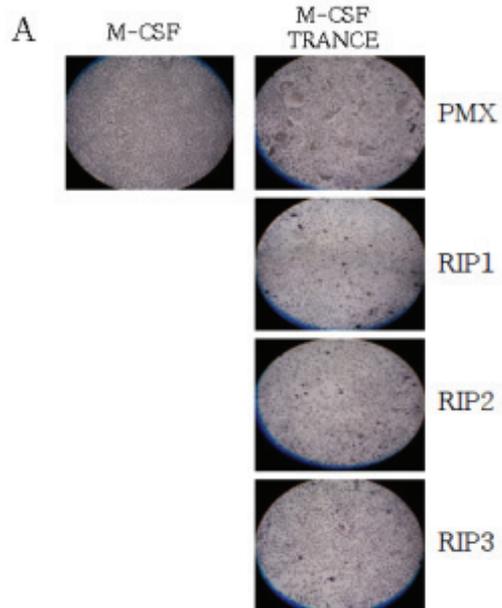


그림 3. RIP 과발현은 파골세포 분화를 억제

- a) BMM세포에서 TRAP으로 염색된 파골세포
- b) TRAP으로 염색된 세포의 숫자

Figure 3. Overexpression of RIPs in BMM inhibits osteoclastogenesis

- A) Stained osteoclast for TRAP on BMM
- B) Numbers of TRAP-positive cells

파골세포 즉 다핵세포를 TRAP 염색하여 RIP의 과발현으로 파골세포 분화에 미치는 정도를 알아 본다. 그 결과 <그림 3>에서 보는 바와 같이 RIPs을 파골세포에서 과발현 시키면 파골세포의 분화

를 저해함을 볼 수 있다.

파골세포의 분화에 관여하는 중요 유전자들의 발현을 관찰하기 위하여 RIPs을 파골세포에서 과발현하여 분화 관련 유전자를 RT-PCR 수행하였다. 그 결과 TRAP, OSCAR, NFATc1의 발현이 저해되는 것을 확인하였다 <그림 4>.

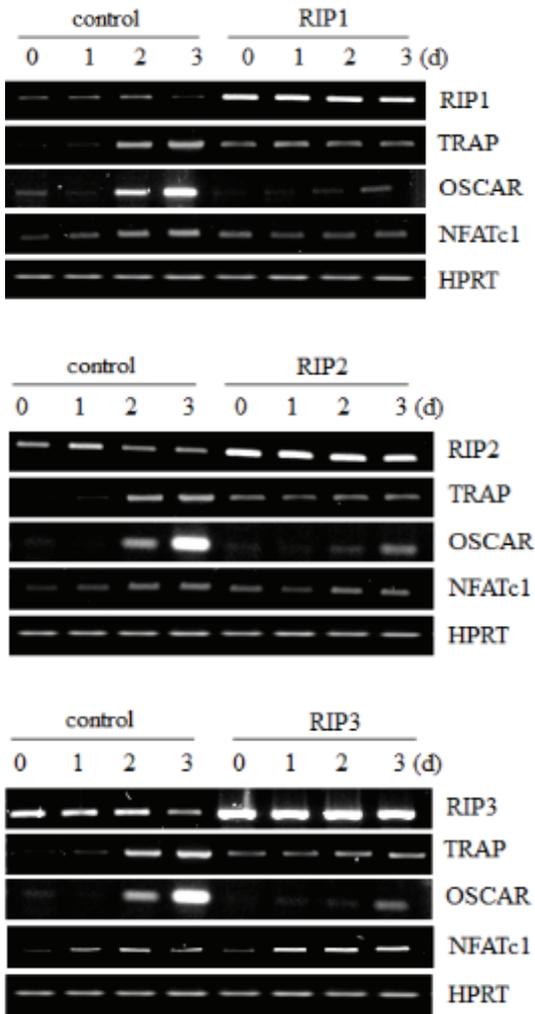


그림 4. BMMs세포에서 RIPs 과발현
Figure 4. RIPs overexpression in BMMs

3. 결 론

RIP은 TRANCE에 의해 유도된 파골세포의 분화 과정중에 발현양이 감소하고 있다. 파골세포 분화 시 RIP의 발현패턴을 RT-PCR로 분석한 결과 RIP은 파골세포 분화시에 1일째부터 3일째까지 발현양이 서서히 감소하고 있다. 이러한 발현 양상은 TRANCE에 의해 RIP의 발현이 저해 받고 있다는 증거이며 분화의 초기에 RIP은 파골세포의 분화가 진행되지 못하도록 잡고 있다고 볼 수 있다. 따라서, RIP을 파골세포에 과발현 시키면 파골세포의 분화를 억제한다.

TRANCE와 TNF- α 의 동시 처리에 의해 유도되는 파골세포 분화시에 RIP의 발현패턴은 TRANCE에 의해 유도된 파골세포의 분화에서 나타나는 발현 양상과 동일하다. TRANCE와 TNF- α 의 동시 처리에 의해 유도되는 파골세포에 RIP을 과발현하여도 TRANCE에 의해 유도된 파골세포의 저해 양상과 동일하다. 파골세포의 분화에 중요한 전사인자인 NFATc1 과 OSCAR는 RIP의 과발현에 의해 발현이 저해됨을 확인하였다.

최근 골다공증에 의한 골절환자가 증가하는 추세로 골다공증 그 자체뿐 아니라 고관절, 골절로 인한 부상, 장애, 사망자 수가 늘어남으로써 골 질환 치료비가 기하급수적으로 증가할 것으로 예상되는데 효과적인 치료제 개발이 골 질환 관련 치료비 및 부대비용의 지출을 줄여줄 수 있을 것으로 기대하고 있다. RIP의 파골세포 분화조절에 대한 기작을 밝힘으로써 골 질환(예; 골다공증-폐경 후 여성 골다공증포함)에 대한 치료제 개발로 응용 가능성 제시하였고 골다공증 치료제뿐만 아니라 관절염과 같은 자가면역 질환 등의 염증성 질환들에 대한 치료제 개발에도 중요한 학문적 연구 자료를 제공하고 있다.

RIP1 과발현 마우스 모델을 제작하여 TRANCE

를 주입하고 마우스의 골밀도를 측정하여 파골세포의 분화와 골다공증의 정확한 발병 원인과 기능을 확인할 수 있다면 RIP은 파골세포의 분화를 억제하고 골다공증과 같은 골관련 질병의 치료물질로 사용될 수 있다고 예상된다.

References

- [1] W. J. Boyle, W. S. Simonet, and D. L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*, Nature, Vol. 423, pp. 337-342, 2000.
- [2] H. Takayanagi, *Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems*, Nature Reviews Immunology, Vol. 7, pp. 292-304, 2007.
- [3] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, and T. Suda, *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANK*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, Vol. 95, pp. 3597-3602, 1998.
- [4] B. F. Boyce, T. Yamashita, Z. Yao, Q. Zhang, F. Li, and L. Xing, *Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts*, Journal of Bone and Mineral Metabolism, Vol. 23, pp. 11-15, 2005.
- [5] T. Koga, M. Inui, K. Inoue, S. Kim, A. Suematsu, E. Kobayashi, T. Iwata, H. Ohnishi, T. Matozaki, T. Kodama, T. Taniguchi, H. Takayanagi, and T. Takai, *Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis*, Nature, Vol. 428, pp. 758-763, 2004.
- [6] H. Takayanagi, S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Toshida, H. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E. F. Wagner, T. W. Mak, T. Kodama, and T. Taniguchi, *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFATc2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclast*, Developmental Cell, Vol. 3, pp. 889-901, 2002.
- [7] E. Meylan, and Jürg. Tschopp, *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*, TRENDS in biochemical Sciences, Vol. 30(3), pp. 151-9, 2005.
- [8] T. H. Lee, J. Shank, N. Cusson, and M. A. Kelliher, *The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- α -induced I κ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2*, J. Biol. Chem, Vol. 279, pp. 33185-33191, 2004.
- [9] K. Shimada, S. Chen, P. W. Dempsey, R. Sorrentino, R. Alsabeh, A. V. Slepkin, E. Peterson, T. M. Doherty, D. Underhill, T. R. Crother, and M. Arditi, *The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against Chlamydomphila pneumoniae lung infection*, PLoS Pathog, Vol. 5(4), pp. e1000379, 2009.
- [10] L. Moreno, S. K. McMaster, T. Gatheral, L. K. Bailey, L. S. Harrington, N. Cartwright, P. C. Armstrong, T. D. Warner, M. Paul-Clark, and J. A. Mitchell, *Nucleotide oligomerization domain 1 is a dominant pathway for NOS2 induction in vascular*

smooth muscle cells: comparison with Toll-like receptor 4 responses in macrophages, Br J Pharmacol, Vol. 160(8) pp. 1997-2007, 2010.

[11] K. Moriwaki, and F. Ka-Ming. Chan, *RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation*, Genes Dev, Vol. 27(15), pp. 1640-1649, 2013.

파골세포 분화에서 RIP의 기능

이준원

배재대학교 바이오·의생명공학과

요 약

뼈는 지속적으로 조골 세포와 파골 세포에 의해 리모델링된다. 뼈 매트릭스를 형성하는 조골 세포와 뼈를 흡수하는 파골 세포사이의 적절한 균형이 뼈 대사에 필수적이며, 이러한 과정은 국부적인 미세 환경에서 다양한 호르몬과 사이토카인에 의해 조절된다. 파골 세포는 뼈에만 존재하는 다핵 세포이며 석회질의 흡수를 전문으로 하는 세포이다. 파골 세포는 골수의 조혈 세포에서 파생했고, nuclear factor NF- κ B ligand (TRANCE, RANKL)의 수용체 활성화에 의해 자극되어 진다. RIP는 T 세포의 활성화에 의해 잠재적인 항염증의 강력한 치료제로 알려져 있다. 그러나, 파골 세포의 분화에서 RIP의 저해 효과는 불분명하다. 본 연구에서는 골 흡수에 대한 파골 세포 분화에서 RIP의 효과를 조사 하였다. RIP은 TRANCE에 의해 유도된 파골 세포 분화를 저해하여 조절한다. 파골세포 분화 동안에 RIP의 발현 수준은 TRANCE에 의해 상당히 감소된다. 골수 유래 단핵구/대식세포 계통의 세포(BMMs)에서 RIP을 과발현시키면 TRAP 다핵 파골 세포의 형성을 억제한다. 또한, BMMs에서 RIP의 과발현은 TRANCE 유도 파골 세포의 분화 동안에 NFAT C1 과 OSCAR 유전자의 발현 유도를 저해한다. 이러한 결과로부터 RIP은 TRANCE 유도 파골 세포의 중요한 조절유전자의 역할을 할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No.2010-0004620).



Junwon Lee received the bachelor and master's degrees in Genetic Engineering from the PaiChai University in 1993 and 1996, respectively. He received the Ph.D. degree in the Department of Biotechnology from Yonsei University in 2001. From 2002 to 2004, he was a researcher at University of Pennsylvania School of Medicine and University of Pittsburgh. He has been a professor in the Department of Biomedical Science & Biotechnology at PaiChai University since 2008. His current research interests include functional materials for disease and biological convergence systems. He is a life member of the KKITS.

E-mail address: junwon@pcu.ac.kr