

## FGF signaling이 연골 형성에 미치는 영향

박충제 · 이상원\* · 남순현 · 김영진 · 류현모\* · 김현정

경북대학교 치과대학 소아치과학교실, 생화학교실\*

### 국문초록

막내골화와 연골내골화 등의 정상적인 골격 성장은 섬유아세포 성장인자 (FGF) 와 이들 수용체들 (FGFR) 에 의한 신호 전달체계에 의해 조절된다. 또한 전사조절인자인 Runx2 (Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ /AML3) 는 골아세포분화 뿐만 아니라 골형성에도 필수적인 유전자로 알려져 있다. FGF signaling이 mouse의 두개관과 하악에서의 연골 형성에 어떤 영향을 미치고 있으며, 이 과정에서 Runx2의 연관성을 알아보려고 in vivo 및 in vitro 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

두개관과 하악을 Alcian blue 염색한 결과 시상두개봉합부 연골은 태생16일부터, Meckel's 연골은 태생11일부터 형성되기 시작하였다. 이들 연골세포들의 성상을 알아보기위한 in situ hybridization 결과 시상두개봉합부 연골 및 Meckel's 연골 모두에서 type II collagen은 발현되었으나, Type X collagen은 발현되지 않았다. Runx2 mRNA는 시상두개봉합부 연골과 Meckel's 연골 모두에서 발현되지 않았지만, 이들 연골들의 가장자리를 둘러싸고 있는 독특한 발현양상을 나타내었다. 두개봉합부에서의 FGF2 protein의 국소적 적용은 두개봉합부 하방의 연골형성을 억제하였다. 또한 하악의 Meckel's 연골 발생 부위에 FGF2 protein의 국소적 적용 역시 Meckel's 연골의 형성을 억제하였다. FGF2 protein은 시상두개봉합부상의 bead 주위로 Runx2의 발현을 유도하였다.

이 결과들을 종합해볼 때, FGF signaling은 골아세포와 연골아세포가 공존하고 있는 조직에서의 연골 형성을 억제하고 있음을 시사해 주고 있으며, 이 과정에서 FGF signaling은 부분적으로 Runx2 유전자의 발현을 조절하므로써 연골세포의 증식과 분화에 관여할 것으로 사료된다.

**주요어** : FGF signaling, Runx2, 두개봉합부, Meckel's 연골, 연골형성

### I. 서론

골격구조는 뼈와 연골로 구성되어 있으며, 뼈 형성은 막내골화 및 연골내골화 과정에 의해 이루어진다. 하지만 연골중 일부는 석회화되지 않고 평생동안 연골의 특성을 지닌 상태로 유지

된다<sup>1)</sup>. 사지를 구성하는 장골, 등뼈 및 갈비뼈 등은 연골전구체에 의한 골화로 성장하나, 두개안면골은 대부분 막내골화에 의해 형성된다. 특히 하악골과 mouse의 두개관은 막내골화에 의해 주성장을 하면서, 발생초기 조직내에 연골이 존재하는 특이한 형태를 갖고 있다.

골격의 형태와 상대적인 비례성은 성장인자, 수용체 그리고 전사조절인자 등이 포함되어 있는 일련의 복잡한 신호전달체계에 의해 조절된다<sup>2)</sup>. 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factors; FGF)와 이들 수용체들 (FGF receptors; FGFR) 은 뼈의 균형적인 성장과 발달에 밀접한 연관성을 갖고 있으며<sup>3-6)</sup>, FGF 수용체들의 점돌연변이에 의해 우성유전 골격이상인 craniosynostosis가 야기될 수 있다는 보고들에 의해 이들 유전자들의 중요성이 더욱 강조되었다<sup>7)</sup>. FGF 수용체는 세포내에

교신저자 : 김현정

대구광역시 중구 동인동 2가 101

경북대학교 치과대학

Tel : 053-420-5961

E-mail : jungkim@kyungpook.ac.kr

\*이 논문은 2002년도 한국과학재단 21세기 Frontier RND program 연구비에 의해 연구되었음.

Tyrosine kinase domain과, 세포밖에는 3개의 immunoglobulin-like domain (IgI, IgII, IgIII)으로 이루어진 transmembrane receptor로 4 종류(FGFR1-4)가 알려져 있으며, ligand인 최소 23개 FGF들과 다양한 친화력을 갖고 있다<sup>8-10</sup>. FGF들의 생물학적 효과는 FGF가 저친화력<sup>11</sup>을 가진 heparan sulphate proteoglycan과 결합하므로써 쉽게 고친화성을 갖고 있는 FGF 수용체와 결합할 수 있으며, 이 결과 FGF 수용체의 tyrosine kinase가 활성화되므로써 세포내 signal transduction이 유도된다<sup>11</sup>. FGF 수용체들중 FGFR-1, -2, -3의 점돌연변이들에 의해 Craniosynostosis 증후군이 야기될 수 있으며, 특히 FGFR2의 IgIII domain에서의 점돌연변이는 여러가지 형태의 craniosynostosis 즉, Crouzon, Jackson-Weiss, Pfeiffer, Apert, Beare-Stevenson syndrome 등과 깊은 관련성이 있음이 보고되었다<sup>12-15</sup>. 이와 더불어 FGFR3는 IgII와 IgIII사이의 link부위, transmembrane domain, kinase domain 등의 점돌연변이들에 의해 achondroplasia, hypochondroplasia, Thanatophoric dysplasia 등의 dwarfism 증후군을 야기할 수 있다<sup>7,16-18</sup>. 또한 craniosynostosis와 dwarfism 증후군들의 대부분이 FGFR의 ligand인 FGF-dependent signaling에 의한 것이 아니라, FGFR signaling의 constitutive activation에 의해 초래된다고 알려져 있다<sup>7,19</sup>. 이런 사실들은 FGF signaling이 막내골화 과정뿐만 아니라 연골내골화에 의한 경골 형성에도 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사해 주고 있다.

Runt-domain gene family에 속하는 전사조절인자인 Runx2 (Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ /AML3)가 knockout된 mouse에서 막내골화 및 연골내골화가 완전히 억제되었으며, 인간의 유전성 골격질환인 쇄골두개이형성증 (cleidocranial dysplasia; CCD) 환자의 유전학적 분석 및 Runx2 heterozygous mouse를 통해 Runx2가 CCD와 밀접한 연관성을 가지고 있음이 보고되면서, 골아세포 분화와 골형성 과정에 Runx2가 필수적인 유전자임이 밝혀졌다<sup>20,21</sup>. 최근 Runx2의 overexpression은 연골세포의 조기 성숙을 유도하므로써 연골내골화를 가속화시키나, dominant negative (DN)-Runx2의 경우는 연골세포의 성숙을 억제하여 연골내골화를 지연시킨다는 사실이 보고되었다<sup>22</sup>. Park 등<sup>23</sup>은 두개봉합부의 형태발생과정에서의 Runx2 isoform들의 역할을 밝히면서, 골아세포 분화 초기부터 후기까지 전단계에 걸쳐 Runx2가 관여하고 있음을 제시하였다.

본 연구의 목적은 골아세포분화의 증식과 분화의 균형을 조절하는데 중요한 FGF signaling이, 기관형성 초기에 뼈와 연골을 함께 공유하고 있는 조직인 mouse의 두개관과 하악골에서의 연골 형성과 유지에 어떤 영향을 미치고 있는지, 또한 이 일련의 과정에서 FGF signaling이 Runx2 유전자를 조절하는지를 알아보려고 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

두개봉합부 발생과정에서의 각 유전자들의 발현을 관찰하기 위하여 presumptive 시상두개봉합부를 관찰할 수 있는 시기인 태생 15일 (E15) 부터 출생후 3일 (P3) 까지의 mouse (ICR)를 각 5마리씩 사용하였으며, FGF2가 두개봉합부 하방의 연골 형성에 어떤 영향을 미치는지를 알기위한 기관배양실험을 위해 E15.5 mouse 20 마리를 사용하였다. 하악의 Meckel's 연골의 형태발생과정에서의 각 유전자들의 발현을 관찰하기 위하여 태생 11일 (E11) 부터 태생 15일 (E15) 까지의 mouse (ICR)를 각 5마리씩 사용하였으며, FGF2에 의한 Meckel's 연골형성의 영향을 관찰하기 위한 기관배양실험을 위해 E11 mouse 20 마리를 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### Tissue preparation

Mouse의 두개골을 입체현미경을 이용하여 Dulbecco's phosphate buffered saline (pH 7.3)에서 두개관 (E15-P3)과 하악골 (E11-E15)을 각각 분리한 후, 4% paraformaldehyde /PBS에 4 °C를 유지하면서 하룻밤동안 고정시킨다. Ethanol series로 탈수한 후 파라핀에 매물시킨다. Microtome을 이용하여 5  $\mu$ m 절편조직을 만들어 수산화규수로 처리된 슬라이드 (silanized slide) 상에 mount한 후 사용할 때까지 4 °C에서 보관한다.

#### Organ cultures of calvaria and mandibles

E15.5 mouse로부터 조심스럽게 박리한 두개관과, E11 mouse로부터 채득한 하악골을 Trowell-type organ culture system에서 배양한다. metal grid위에 위치한 polycarbonate nucleopore filter (pore size : 0.1  $\mu$ m) 상에 두개관 explant를 올려놓고, 10% FBS, penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) 배양액에서 37 °C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub>공기혼합 배양기에서 두개관은 48시간동안, 하악골은 72시간동안 배양한다. 100  $\mu$ g/ml의 ascorbic acid를 매일 첨가한다.

#### Treatment of beads

Heparin acrylic beads (125-150  $\mu$ m in diameter; Sigma) 혹은 Affi-Gel blue agarose beads (75-150  $\mu$ m in diameter; Bio-Rad)를 PBS로 잠깐 세척한 후, 입체현미경하에서 100개를 세어 E-tube내로 옮긴 후 PBS를 완전히 제거한다. Recombinant FGF-2 protein은 heparin acrylic beads가 들어있는 E-tube내에, recombinant human BMP-4 protein (100 ng/ $\mu$ l)은 Affi-gel blue agarose beads가 들어있는

### Ⅲ. 성 적

E-tube내에 넣고 37 °C에서 30분간 배양한다. 대조군으로는 같은 농도의 BSA를 사용하여 동일한 방법으로 BSA bead를 제작한다. 각 protein이 흡수된 bead를 배양액에서 빠르게 한번 세척한 후, mouth-controlled capillary pipette을 사용하여 organ culture system위에 놓여있는 explants 위에 위치시킨다. 두개관의 osteogenic front 및 간엽조직 상에 3-4개의 beads를, 하악골의 Meckel's 연골이 형성될 부위에 2-4개의 beads를 위치시킨다.

#### Probe preparation and In Situ Hybridization (Sectional : 35S-UTP labeled riboprobes)

35S-UTP를 이용한 sectional in situ hybridization을 위해서 murine Runx2, Type II collagen, Type X collagen cDNA들을 사용하였다. Antisense 및 sense riboprobe를 제작하기 위해 pBluescript SK vector내 삽입되어 있는 Runx2의 1600bp fragment를 BamHI과 XbaI 제한효소로 각각 소화시키고 T3과 T7 RNA polymerase로 각각 전사시킨다. Type II collagen은 pBluescript SK vector에 삽입되어 있는 1217bp fragment를 XbaI 제한효소로 소화시키고 SP6 RNA polymerase로 전사시켜 antisense riboprobe를 제작하였다. Type X collagen은 pBluescript SK vector에 삽입되어 있는 1217bp fragment를 XbaI 제한효소로 소화시키고 SP6 RNA polymerase로 전사시켜 antisense riboprobe를 제작하였다.

35S-UTP labeled riboprobes를 사용하는 sectional in situ hybridization은 Kim 등<sup>2)</sup>에 준해 시행하였다. 실험할 조직들을 xylene, ethanol series를 통해 파라핀을 제거한 후, proteinase K로 약 15분동안 전처리하여 신선한 4% PFA/PBS용액으로 재고정시킨다. Background를 감소시키기 위한 전처리로 2.5 ml acetic anhydride /0.1M tri-ethanolamin-HCl 혼합용액에 10분간 수세한 후 ethanol series를 통해 탈수 건조시킨다. 준비된 riboprobe들을 중합 용액으로 희석하여 80 °C에서 2분간 열처리한 후, 실험할 조직과 50 °C에서 하루밤동안 중합시킨다. 중합후 후처리로 고점도 용액(50% formamide) 과 ribonuclease A 20 µg/ml NTE 용액등을 사용하여 background를 감소시킨다. 건조된 조직절편 slide들을 자기방사성 감광유제 (autoradiographic emulsion)에 담근 후 검은 상자에 넣어 foil로 완벽하게 봉하여 4 °C 암실에서 보관한다. 각 probe 종류에 따라 2-4주 정도 감광시킨후, 현상, 고정하고 hematoxylin으로 대조염색한 후 mounting하여 현미경하에서 관찰한다.

#### Alcian Blue Staining

준비된 조직들을 xylene series로 탈파라핀한 후, ethanol series (100%, 90%, 80%, 70%)로 함수시킨다. 증류수로 수세시킨 후 alcian blue 용액으로 염색시킨다. 다시 증류수로 수세시킨 후 kernechtrot 용액으로 3분 내지 5분간 대조염색시켜 mounting한다.

#### 1. Alcian blue staining on the sagittal suture of calvaria

Sectional alcian blue 염색법을 이용하여 시상두개봉합부에 존재하는 연골의 형태를 관찰하였다 (Fig. 1). Sectional alcian blue 염색결과, 시상두개봉합부가 처음으로 인지되는 태생15일에서는 연골을 관찰할 수 없었다 (Fig. 1 A). 태생16일부터 시상두개봉합부 하방에 봉합부 간엽조직을 완전히 둘러싼 형태의 연골을 관찰할 수 있었으며 주위 두정골쪽으로 어느 정도 뻗어 있는 양상을 나타내었다 (Fig. 1 B). 태생18일, 출생후 3일에도 유사한 형태로 존재하는 연골을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1 C, D). 연골은 2-4층의 세포들로 이루어져 있으며, 형태적으로는 hypertrophic chondrocyte와 유사하였다 (Fig. 1 B, C, D).

#### 2. 발육중인 두정골과 시상봉합부 및 하방 연골에서의 type II collagen, type X collagen, Runx2 유전자들의 발현 양상

35S-UTP riboprobe를 이용한 sectional in situ hybridization 방법으로 두정골과 시상봉합부 및 하방 연골에서의 type II collagen, type X collagen, Runx2 유전자들의 발현 양상을 조사하였다 (Fig. 2) (Fig. 3). Type II collagen mRNA는 E18, P3 두개봉합부 하방연골조직에 강하게 발현되었으나 봉합부 간엽조직, osteogenic front, 두정골 및 hair follicle에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 2 A, C). Type X collagen mRNA는 두개봉합부 하방연골을 포함한 모든 조직에서 관찰되지 않았다 (Fig. 2 B, C). Runx2 mRNA는 E15부터 P1까지 시상두개봉합부 간엽조직, osteogenic front, 두정골의 골막과 hair follicle에 발현하였으나 두개봉합부 하방 연골에서는 발현되지 않았으며, 특이하게 연골의 가장자리를 둘러싸고 있는 독특한 발현양상을 나타내었다 (Fig. 3).

#### 3. FGF2 protein bead implication on the sagittal suture of calvaria

시상두개봉합부의 하방연골 발생과정에 미치는 FGF signaling의 효과를 알아보기 위해, rhFGF-2 protein은 heparin acrylic beads를 이용하여, E15.5 mouse의 두개봉합부 주위 조직중 osteogenic front와 봉합부 간엽조직상에 위치시켜 in vitro에서 48시간동안 기관배양하고, 대조군으로는 rhBMP-4 soaked beads 및 BSA-soaked beads를 동일한 방법으로 in vitro에서 48시간 동안 기관배양하여 실험조직들을 alcian blue 용액으로 염색하였다. FGF2 protein의 overexpression에 의해 조직의 부피와 세포수는 증가하였으나 연골을 표지해주는 alcian blue 염색은 관찰되지 않았다. 그러나 BMP4 pro-

tein의 overexpression에 의해서 조직의 부피와 세포수의 증가 하였으며, 두개봉합부 하방연골부위에 alcian blue 염색을 관찰할 수 있었다. 또한 BSA에 의해서도 봉합부 하방연골부위에 alcian blue 염색을 관찰할 수 있었다.

4. Recombinant human protein의 overexpression에 의한 발육중인 두정골과 시상봉합부에서의 Runx2 유전자의 발현유무

시상두개봉합부 및 하방연골의 발생과정에서, FGF signaling pathway의 하방에 Runx2 유전자의 존재유무를 알아보기 위해, rhFGF-2 protein은 heparin acrylic beads를 이용하여, E15.5 mouse의 두개봉합부 주위조직중 osteogenic front에 위치시켜 in vitro에서 48시간동안 기관배양하고, 대조군으로는 BSA-soaked beads를 동일한 방법으로 in vitro에서 48시간동안 기관배양하여 in situ hybridization 방법으로 Runx2 mRNA의 발현을 관찰하였다 (Fig. 5). FGF2 protein을 국소적으로 적용시켜 Runx2 유전자의 발현유무를 조사한 결과, FGF2 bead들 주위로 Runx2 mRNA가 강하게 발현되었으나 (Fig. 5 A), 대조군인 BSA bead들 주위로는 발현되지 않았으며 단지 시상봉합부의 간엽조직에 내인성 Runx2 mRNA의 미약한 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5 B).

5. Morphogenesis of Meckel's cartilage

Whole mount와 sectional alcian blue 염색법을 이용하여 Meckel's 연골의 형태발생과정을 관찰하였다 (Fig. 6)(Fig. 7). Meckel's 연골은 전방부분 (anterior or rostral end), 중앙부분 (midportion), 후방부분 (posterior or auricular end) 등 세부분으로 구성되어 있다<sup>36)</sup>. Whole mount alcian blue 염색결과, 태생11일 하악에서는 아직 Meckel's 연골을 관찰할 수 없었다 (Fig. 6 A) 태생12일경 하악체의 양쪽에 Meckel's 연골의 전체길이의 후방 2/3 정도 (midportion과 auricular end가 포함됨) 가 alcian blue로 염색되어 있었으며 (Fig. 6 B), 태생13일의 하악에서는 Meckel's 연골의 전방까지 alcian blue로 염색되어 하악의 정중앙에서 연골들이 서로 접촉한 양상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6 C). 태생15일경에는 전방부위 Meckel's 연골이 삼각형 의 모양을 갖추면서 완성된 형태의 Meckel's 연골을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6 D). Sectional alcian blue 염색을 위해, 태생11, 12, 15일의 조직절편들은 Meckel's 연골의 중앙부분을, 태생13일의 조직절편은 Meckel's 연골의 최전방부위가 관찰될 수 있도록 하악을 coronal section하였다. Sectional alcian blue 염색결과, 태생11일에서는 Meckel's 연골을 관찰할 수 없었으며 (Fig. 7 A), 태생12일, 태생15일에는 하악의 양측에 (Fig. 7 B, D), 태생13일에는 하악의 중앙에 Meckel's 연골을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7 C). 특히 태생12일, 태생15일에 관찰되는 Meckel's

연골의 중앙부분은 각각 bud, cap stage의 발육중인 구치치배의 전하방에 위치하고 있었다 (Fig. 7 B, D).

6. Meckel's 연골과 주위조직에서의 type II collagen, type X collagen, Runx2 유전자들의 발현양상

35S-UTP riboprobe를 이용한 sectional in situ hybridization 방법으로 하악골에서의 type II collagen, type X collagen, Runx2 유전자들의 발현양상을 조사하였다 (Fig. 8). Type II collagen mRNA는 Meckel's 연골이 형성되지 않은 시기인 (alcian blue 염색이 안됨) 태생11일에 이미 발현이 관찰되었으며, 태생15일까지 Meckel's 연골부위에 강하게 발현되었으나 하악의 다른 부위에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 5 A, C, E, G). Type X collagen mRNA는 태생11일에서 태생15일까지 하악의 모든 조직에서 관찰되지 않았다 (Fig. 5 B, D, F, H). Runx2 mRNA는 태생11일 하악의 막내골화되는 중심부에 발현되었으며 (Fig. 9 A), 태생12일에서 태생15일로 갈수록 발현영역이 넓어지면서 강도는 약해지는 양상을 보였다 (Fig. 9 B, C, D). Runx2 mRNA가 Meckel's 연골에서는 발현되지 않았으며, 특이하게 연골의 가장자리를 둘러싸고 있는 독특한 발현양상을 나타내었다 (Fig. 9 B, C, D). 또한 Runx2는 발육중인 치아의 치유두 (dental papilla) 와 치낭 (dental follicle) 에 강하게 발현되었다 (Fig. 9 B, D).

7. Whole mount alcian blue staining : FGF2 bead treatment on mandible (Fig. 10)

하악의 Meckel's 연골 발생과정에 미치는 FGF signaling의 효과를 알아보기 위해, 태생11일 mouse의 Meckel's 연골이 형성될 부위에 rhFGF-2 protein-soaked beads를 위치시켜 in vitro에서 72시간동안 기관배양하고, 대조군으로는 BSA-soaked beads를 동일한 방법으로 기관배양하여 실험조직들을 alcian blue 용액으로 염색하였다. 72시간 기관배양후 하악을 alcian blue 염색결과 BSA bead 주위로는 태생12일경의 Meckel's 연골과 유사한 성장상태의 Meckel's 연골을 관찰할 수 있었으나, FGF2 bead 주위로는 연골형성이 억제된 양상을 나타내었다.

IV. 고 찰

척추동물에서의 골격의 형성은 두가지 기본적인 골화과정인 막내골화 및 연골내골화에 의해 이루어진다. 막내골은 미분화 간엽세포에서 직접 골아세포로 분화되어 골기질을 분비하고 석회화과정을 거쳐 형성되나, 연골성 경골은 간엽세포에서 분화된 연골세포에 의해 형성된 연골판을 반드시 필요로 하며, 이들 연골세포들이 증식, 비대의 과정을 거쳐 결국 경골로 대체된다. 그러나 발육중인 관절연골, 비중격 등에 존재하는 연골세포들

은 연골성 골화과정으로 들어가지 못하고 평생동안 연골로 남아 영구연골을 형성한다<sup>1)</sup>. Mouse의 두개관과 하악골은 막내골화와 연골형성이 동시에 이루어지는 특이한 조직들이다. 그러나 그 조절기전은 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 먼저 두개봉합부 하방의 연골 (시상두개봉합부 연골)의 형태발생을 관찰하기 위해, 각각 태생15일부터 출생후 3일까지의 두개관을 alcian blue 염색을 시행하였으며, 연골세포의 성상을 알아보기 위해서는 in situ hybridization 방법으로 type II collagen과 type X collagen 유전자들의 발현양상을 관찰하였다. 시상두개봉합부 연골은 태생15일에는 alcian blue 염색이 되지않아 연골형성이 되지않았음을 보여주었고, 태생16일부터 시상두개봉합부 간엽조직을 완전히 둘러싼 형태로 주위 두정골쪽으로 어느 정도 뻗어 있는 양상의 연골을 관찰할 수 있었다. 출생후 3일경까지도 유사한 모양의 시상두개봉합부 연골을 관찰할 수 있었다. 두정골과 시상봉합부 및 하방 연골에서의 type II collagen, type X collagen 유전자들의 발현양상을 조사한 결과, type II collagen mRNA는 시상두개봉합부 연골조직에 강하게 발현되었으나 type X collagen mRNA는 시상두개봉합부 연골을 포함한 모든 조직에서 관찰되지 않았다. 이 결과들을 분석해 볼 때, 시상두개봉합부 연골의 세포들은 형태적으로 비대연골세포처럼 보였으나 type X collagen이 발현되지 않은 것으로 보아 연골성 골화로 진입될 수 있는 연골세포들로 구성된 연골이 아니라, 태생후기 급속한 뇌의 성장과 균형을 이루기 위해 두개골 성장의 중추부인 두개봉합부 하방에 일시적으로 형성된 연골로 사료된다. 그리고 이때 두개골 중에서 특히 두개봉합부 하방에만 연골이 형성되는 이유는 시상두개봉합부의 세포성상과 연관성이 있을 것으로 사료된다. 뇌가 급속하게 성장하면서 뇌에서 나오는 어떤 signaling이 두개골과 두개봉합부에 동일하게 전달되나, 두정골 부위의 이미 분화된 골아세포들보다는 두개봉합부의 미분화간엽세포들로부터 연골세포들로 commit시켜 연골을 형성하게 하지 않을까? 그러나 사람이나 rat에서는 이러한 두개봉합부 연골을 관찰할 수 없어 정확한 발생과 존재이유는 아직도 연구의 대상이다.

Meckel's 연골은 제일새궁 (first branchial arch)에서 유래하며, Meckel's 연골의 연골세포들은 위치 특이적인 운명을 가진다<sup>25,26)</sup>. Meckel's 연골의 전방부와 후방부는 연골성 골화 과정을 거치나, 중앙부는 출생직 후 석회화된 기질의 형성없이 소실된다. Meckel's 연골의 중앙부의 연골세포들은 두 형태의 서로 다른 운명을 갖고 있다. 중앙부의 전방은 세포 흡수에 의해 소실되며, 중앙부의 후방은 섬유아세포들로 변형되어 소실된다<sup>27)</sup>. 본 연구에서는 하악의 Meckel's 연골의 형태발생을 관찰하기위해 태생11일부터 태생15일까지의 하악을 alcian blue 염색을 시행하였다. Meckel's 연골은 태생 11일에는 형성되지 않았으나, 태생12일경 하악체의 양쪽에 처음으로 Meckel's 연골의 전체길이의 후방 2/3 정도를 관찰할 수 있었으며, 태생13일의 하악에서는 Meckel's 연골이 전방까지 alcian blue로 염색되면서 전방부 연골들이 하악의 최전방부에서 서로 접촉하여

좌우 하악체로 양분되어 있던 Meckel's 연골이 연결된 양상으로 나타났다. 태생15일경에는 전방부위 Meckel's 연골이 삼각형의 모양을 갖추면서 완성된 형태의 Meckel's 연골을 관찰할 수 있었다. 이 결과들은 Meckel's 연골이 처음부터 완전한 형태를 갖추어서 형성되는 것이 아니라 중앙과 후방에서 시작하여 전방으로 뻗어 나가는 성장양상을 보여주고 있다.

하악의 Meckel's 연골세포의 성상을 알아보기 위해, 연골세포의 표지자인 type II collagen과 비대연골세포의 표지자인 type X collagen 유전자들의 발현을 in situ hybridization 방법으로 분석한 결과 Meckel's 연골에서는 type II collagen은 관찰되었으나 type X collagen은 관찰되지 않았다. 이 결과들은 태생기 Meckel's 연골의 세포들은 연골내 골화과정을 거치는 일시적인 연골세포들이 아니라 영구적 연골세포들로 이루어져 있음을 제시해주고 있다. 그러나 in vitro 실험결과 영구적 연골의 연골세포들도 terminal differentiation phenotype을 발현할 수 있으며<sup>28,29)</sup>, Meckel's 연골 역시 연골성 골화, apoptosis, 세포성 흡수 등의 다양한 소실 기전을 갖고 있는 조직이다. Meckel's 연골이 형성되기 전인 태생11일에 이미 type II collagen이 Meckel's 연골부위에 발현된다는 사실은 하악의 간엽세포들이 이 시기에 chondrogenic progenitor 세포들로 commit 되었다는 사실과 더불어, Meckel's 연골의 형태발생은 부분적으로 시기적 차이를 가지나 Meckel's 연골이 형성될 위치는 이미 정해져 있음을 시사해 주고 있다.

골아세포의 분화와 골형성에 필수적인 유전자인 Runx2가 두개관과 하악골과 같은 막내골화하는 조직속에서 연골들의 형성에 어떤 역할을 하고 있는지 알아보고자 in situ hybridization 방법으로 발현양상을 조사하였다. Runx2 유전자가 미분화간엽세포, preosteoblast, 성숙골아세포들로 구성된 두개봉합부 주위조직인 시상두개봉합부 간엽조직, osteogenic front, 두정골의 골막에 발현된다는 사실은 Runx2가 간엽세포에서 골아세포로의 commitment부터 골아세포의 분화, 성숙 단계 전반에 걸쳐 관여하고 있으며, 궁극적으로 막내골화 과정에 중요한 유전자임을 제시하고 있다. 또한 시상두개봉합부 연골과 Meckel's 연골에서는 Runx2 유전자가 발현되지 않고, 연골의 가장자리를 둘러싸고 있는 독특한 발현양상을 나타낸 연구 결과들은 Runx2유전자가 시상두개봉합부 연골 및 Meckel's 연골의 형성과 유지에는 필요하지 않으나, 이들 연골들의 위치를 제한시키는 기능을 가지고 있다고 사료된다. 영구 연골의 특성화에 대한 기작은 아직 밝혀져 있지 않지만, 영구적 연골에서의 세포비대 및 기질석회화의 부족은 어떤 요인들에 의해 negative 조절을 받고 있기때문이며 그 결과의 하나로 Runx2의 발현이 억제된다<sup>22)</sup>. Runx2 유전자는 비대연골세포들에 정상적으로 나타나는 type X collagen, osteopontin, Matrix metalloproteinase 13 (MMP13)의 발현을 유도할 수 있으며<sup>20,27,30-32)</sup>, Runx2-transgenic mice에서 이소골화 현상 및 비대연골세포들의 phenotype들의 이소발현을 나타내었고, Runx2의 활성화로 인해 영구 연골의 이상이 초래될 수 있다<sup>22)</sup>. 이 연구 결과들은

연구연골에서의 Runx2의 발현은 연골세포들을 연골성 골화과정으로 진입시키므로써 연골의 유지를 저해할 수 있음을 시사해 주고 있다. 본 연구에서 Runx2가 발육중인 bud-, cap-stage 치배의 치유두와 치낭에 강하게 발현되는 양상은 Runx2가 치아발육에도 매우 중요한 유전자임을 제시하고 있다.

막내골화 및 연골성 골화와 밀접한 관련성을 갖고 있는 FGF/FGFR-mediated signaling이 연골형성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, FGF2 protein bead를 두개봉합부 연골이 형성되기 전인 태생15.5일 mouse의 두개봉합부 주위 조직과, 태생11일 mouse의 Meckel's 연골이 형성될 부위에 위치시켜 기관배양한 실험조직들을 alcian blue 용액으로 염색하였다. FGF2 protein의 overexpression은 시상두개봉합부 연골뿐만 아니라 Meckel's 연골의 형성을 억제하였으나, 대조군으로 사용한 BMP4 protein에 의해서는 시상두개봉합부 연골의 형성이 억제되지 않았고, 또한 BSA 대조군에서는 시상두개봉합부 연골과 Meckel's 연골 모두 정상적인 연골형태를 지니고 있었다. 이 결과들은 골아세포분화 및 골형성에 필수불가결한 유전자들인 FGF와 BMP의 연골형성과 유지에 대한 역할이 다르다는 사실을 시사하고 있으며, FGF signaling이, 미분화간엽세포들이 chondrogenic progenitor 세포들로 committing 과정을 차단하거나 이미 commit된 chondroblast precursor들의 연골아세포로의 분화를 저지하므로써 연골형성을 억제하지 않을까 유추된다.

시상두개봉합부 및 하방연골의 발생과정에서, Runx2 유전자가 FGF signaling pathway에 의해 조절받는지를 알아보기 위해, 시상두개봉합부 상에 FGF2 protein beads를 위치시킨 E15.5 mouse의 두개관을 in vitro에서 기관배양하여 Runx2 mRNA의 발현을 관찰한 결과, FGF2 bead들 주위로 Runx2 mRNA가 강하게 발현되었으나, 대조군인 BSA bead들 주위로 발현되지 않았다. 또한 BMP에 의해서는 Runx2가 발현되지 않았다 (unpublished). 이 결과들은 FGF signaling이 연골형성을 억제하는 기전에 Runx2가 관여하고 있음을 제시해 주고 있다.

## V. 요 약

골격의 정상적인 성장은 성장인자, 수용체 그리고 전사조절인자 등이 포함되어 있는 일련의 복잡한 신호전달체계에 의해 조절된다. 섬유아세포 성장인자 (FGF) 와 이들 수용체들 (FGFR) 및 전사조절인자인 Runx2 (Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ A/AML3) 는 골아세포분화에 중요할 뿐만 아니라 막내골화와 연골내골화에도 필수적인 유전자로 알려져 있다. 발생 초기에 뼈와 연골을 함께 공유하고 있는 조직인 mouse의 두개관과 하악에서의 연골 형성에 FGF signaling이 어떤 영향을 미치고 있으며, 이 과정에서 Runx2의 연관성을 알아보려고 in vivo 및 in vitro 실험을 시행하였다.

두개관과 하악을 Alcian blue 염색한 결과 시상두개봉합부

연골은 태생16일부터, Meckel's 연골은 태생11일부터 형성되기 시작하였다. 이들 연골세포들의 성상을 알아보기 위한 in situ hybridization 결과 시상두개봉합부 연골 및 Meckel's 연골 모두에서 type II collagen은 발현되었으나, Type X collagen은 발현되지 않았다. Runx2 mRNA는 시상두개봉합부 연골과 Meckel's 연골 모두에서 발현되지 않았지만, 이들 연골들의 가장자리를 둘러싸고 있는 독특한 발현양상을 나타내었다. 두개봉합부에서의 FGF2 protein의 국소적 적용은 두개봉합부 하방의 연골형성을 억제하였다. 또한 하악의 Meckel's 연골 발생부위에 FGF2 protein의 국소적 적용 역시 Meckel's 연골의 형성을 억제하였다. FGF2 protein은 시상두개봉합부상의 bead 주위로 Runx2의 발현을 유도하였다.

이 결과들을 종합해볼 때, FGF signaling은 시상두개봉합부 연골 및 Meckel's 연골의 형성을 억제하고 있음을 시사해 주고 있으며, 이 과정에서 FGF signaling은 부분적으로 Runx2 유전자의 발현을 조절하므로써 연골세포의 증식과 분화에 관여할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Pacifici M : Tenascin-C and the development of articular cartilage. *Matrix Biol*, 14:689-698, 1995.
2. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, et al. : Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 80:371-378, 1995.
3. Muenke M, Schell U : Fibroblast-Growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends in Genetics*, 11:P308-313, 1995.
4. Iseki S, Wilkie AOM, Heath JK, et al. : Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development*, 124:3375-3384, 1997.
5. Kim HJ, Rice DPC, Kettunen PJ, et al : FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*, 125:1241-1251, 1998.
6. Rice APC, Aberg T, Chan Y-S, et al. : Integration of FGF and Twist in calvarial bone and suture development. *Development*, 127:1845-1855, 2000.
7. Webster MK, Donoghue DJ : FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends in Genetics*, 13:178-182, 1997.
8. Yamaguchi TP, Rossant J. : Fibroblast growth factors in mammalian development, *Curr Opin Gen dev* 5:485-491, 1995.
9. Yamasaki M, Miyake A, Tafashira S, et al :

- Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271: 1591-1592, 1996.
10. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. : Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *PNAS*, 98:6500-6505, 2001.
  11. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD. : Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 84:841-848, 1991.
  12. Jabs EW, Li S, Scott AF, et al. : Jackson-Weiss and Couzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet*, 8:275-279, 1994.
  13. Muenke N, Schell U, Hehr A, et al. : A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet*, 8:269-273, 1994.
  14. Wilkie AOM., Slaney SF, Oldridge M, et al. : Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Couzon syndrome. *Nature Genet*, 9:165-172, 1995.
  15. Bellus GA, Gandenz K, Zackai EH, et al. : Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nature Genet*, 14:174-176, 1996
  16. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, et al. : Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371:252-254, 1994.
  17. Rousseau F, Saugier P, Merrer M, et al. : Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type I. *Nature Genet*, 10:11-12, 1995
  18. Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM : Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genetics*, 9:321-328, 1995.
  19. Galvin BD, Hart KC, Meyer AN, et al. : Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:7894-7899, 1996.
  20. Komori T, Yagi H, Nomura S : Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89:755-764, 1997.
  21. Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. : Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89:765-771, 1997.
  22. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, et al. : Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocyte. *J. Cell Biol*, 153:87-99, 2001.
  23. Park MH, Ahn HI, Choi JY, et al. : Differential expression patterns of Runx2 isoforms in cranial suture morphogenesis. *J Bone Min Res*, 16:885-892, 2001.
  24. Chai Y, Mah A, Crohin C, et al. : Specific transforming growth factor- $\beta$  subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev Biol*, 162:85-103, 1994.
  25. Bhaskar SN, Weinmann JP, Schour I : Role of Meckel's cartilage in the development and growth of the the rat mandible. *J Dent Res*, 32:398-410, 1953.
  26. Chung KS, Park HH, Ting K, et al. : Modulated expression of type X collagen in the Meckel's cartilage with different developmental fates. *Dev Biol*, 170:387-396, 1995.
  27. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, et al. : Cfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biolo Chem*, 274:6972-6978, 1999.
  28. Iwamoto M, Sato K, Nakashimo K, et al. : Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted culture: synthesis of alkaline phosphatase and 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor. *Dev Biol*, 136(2):500-507, 1989.
  29. Stephens M, Kwan AP, Bayliss MT, et al. : Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J Cell Sci*, 103:1111-1116, 1992.
  30. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89:747-754, 1997.
  31. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, et al. : Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol*, 19:4431-4442, 1997
  32. Porte D, Tuckermann J, Becker M, et al. : Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene* 18:667-678, 1999.

## Explanation of Figures

- Fig. 1. Alcian blue staining of sagittal suture of calvaria. At E15, the sagittal suture of calvaria didn't show any Alcian blue staining (A). From E16 sutural cartilage first appeared under sagittal sutural mesenchyme (B), at E18 and P1, Alcian blue staining showed the sutural cartilage surrounding the sagittal sutural mesenchyme (C,D). Sutural cartilage is consisted of two or three cellular layers and is similar with hypertrophic chondrocyte in morphology (B,C,D).
- Fig. 2. Type II collagen and type X collagen expression in the developing mouse parietal bone, sagittal suture and underlying cartilage. Sectional in situ hybridization analysis (using 35S-UTP riboprobe) of tissue sections. at E18 and P1, type II collagen mRNAs were expressed in the sutural cartilage area of calvaria (A,C). Otherwise type X collagen mRNAs were not detected in any area of parietal bone and sutural mesenchyme including sutural cartilage at E18 and P1 (B,D).
- Fig. 3. Runx2 expression in the developing mouse parietal bone, sagittal suture and underlying cartilage. Sectional in situ hybridization analysis (using 35S-UTP riboprobe) of tissue sections. Runx2 mRNAs were expressed in periosteum of parietal bone, osteogenic front and the sutural mesenchyme from E15 to P1 (A-D). On the other hand, Runx2 mRNAs were not detected in the sutural cartilage, but showed specific expression pattern surrounding the outline of sutural cartilage (B-D).
- Fig. 4. The effect of FGF2 beads on the formation of sutural cartilage. Sectional Alcian blue staining on calvaria explants cultured with FGF2 beads for 48 hours didn't show any sutural cartilage formation (A). Otherwise, Alcian blue staining on calvaria explants cultured with both BMP4 beads and BSA beads showed sutural cartilage formations (B,C). b; bead.
- Fig. 5. In vitro effect of FGF2 beads on E15.5 calvarial explants. 35S-UTP labeled in situ hybridization on tissue sections (A,B). FGF2 beads induce Runx2 expression in calvarial mesenchyme (A). BSA beads have no effect on Runx2 expression (B). b, bead.
- Fig. 6. Whole mount Alcian blue staining showed Meckel's cartilage development. At E11, the mandible showed a transparent structure without Alcian blue staining (A). At E12, Meckel's cartilage first formed bilaterally at middle and posterior portions of mandible (B). At E13, Meckel's cartilage extended anteriorly and fused at midpoint of mandible (C). At E15, Meckel's cartilage showed more complete form with triangle-shaped anterior segment (D). Mn; mandible, T; tongue.
- Fig. 7. Sectional Alcian blue staining showed Meckel's cartilage development. For sectional Alcian blue staining, explants at E11, 12, 15 were sectioned coronally in the middle portion of Meckel's cartilage, explants at E13 was sectioned coronally in the most anterior area of Meckel's cartilage. At E11, the mandible showed a transparent structure without Alcian blue staining (A). From E12, Meckel's cartilage was first shown bilaterally in the mandible (B). At E13, E15, Meckel's cartilages were shown in the mandible (C,D).
- Fig. 8. Type II collagen and type X collagen expressions in the developing Meckel's cartilage and surrounding tissues of murine mandible. Sectional in situ hybridization analysis (using 35S-UTP riboprobe) of tissue sections. at E11, type II collagen mRNA was detected in the presumptive Meckel's cartilage area. From E12 to E15, type II collagen mRNA was expressed in developing Meckel's cartilage (C,E,G). On the other hand, type X collagen mRNA was not detected in the presumptive or developing Meckel's cartilage area from E11 to E15 (B,D,F,H).
- Fig. 9. Runx2 expression in the developing Meckel's cartilage and surrounding tissues of murine mandible. Sectional in situ hybridization analysis (using 35S-UTP riboprobe) of tissue sections. Runx2 mRNA was not detected in the presumptive and developing Meckel's cartilage, but showed specific expression pattern surrounding the outline of Meckel's cartilage (A-D). Runx2 mRNAs were also intensively expressed in dental papilla and dental follicles of developing teeth (B-D). Mc; Meckel's cartilage.
- Fig. 10. The effect of FGF2 beads on the formation of Meckel's cartilage in mandible. At the starting point of culture, whole mount Alcian blue staining on mandibular explants at E11 cultured with both FGF2 and BSA beads didn't show any sutural cartilage formation (A). Alcian blue staining on mandibular explants cultured with FGF2 beads and BSA beads for 72 hours showed inhibition of Meckel's cartilage formation around FGF2 beads, but normal Meckel's cartilage formation around BSA beads (B). b; bead, F; FGF2 bead.



사진부도 ①

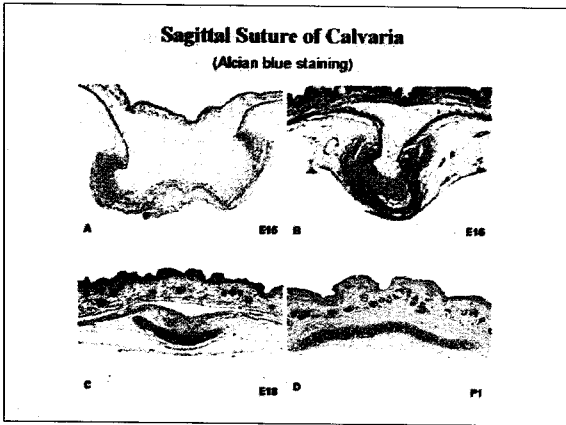


Fig. 1

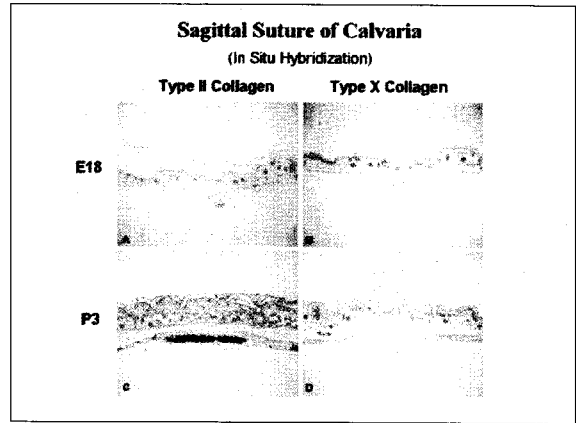


Fig. 2

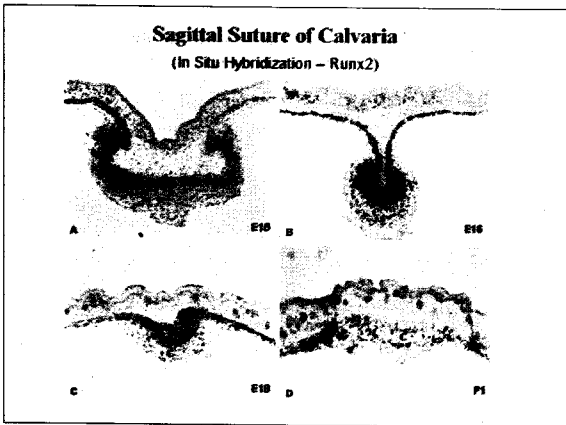


Fig. 3

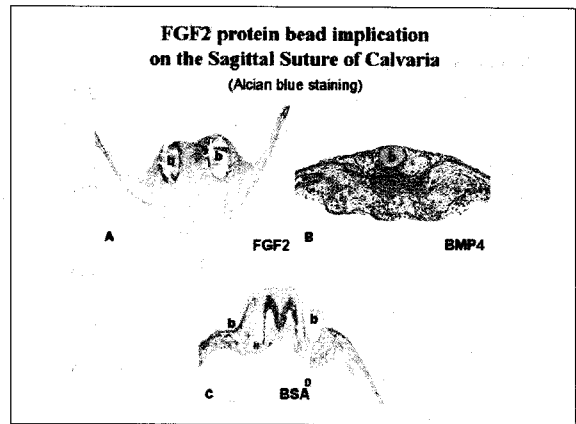


Fig. 4

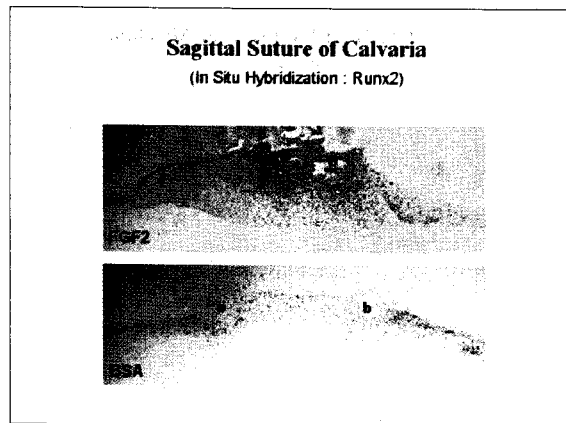


Fig. 5

사진부도 ②

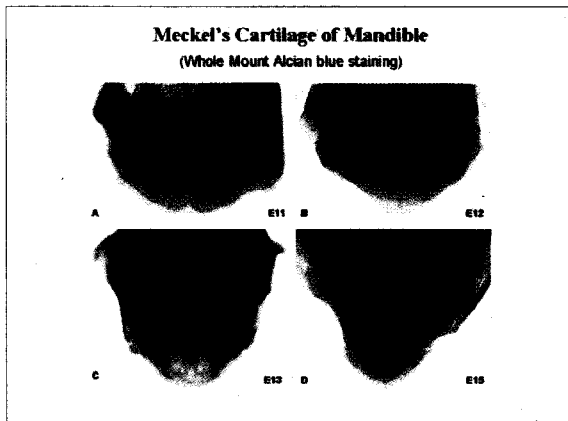


Fig. 6

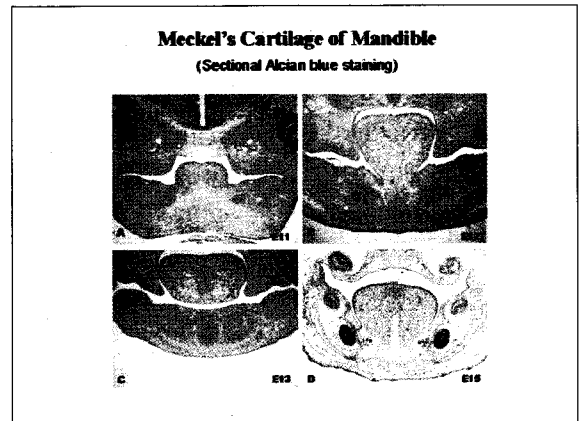


Fig. 7

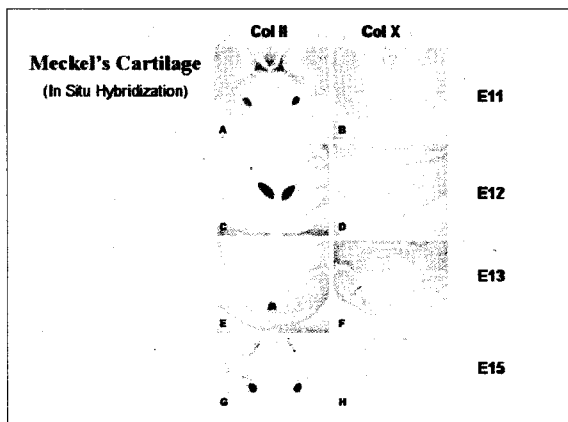


Fig. 8

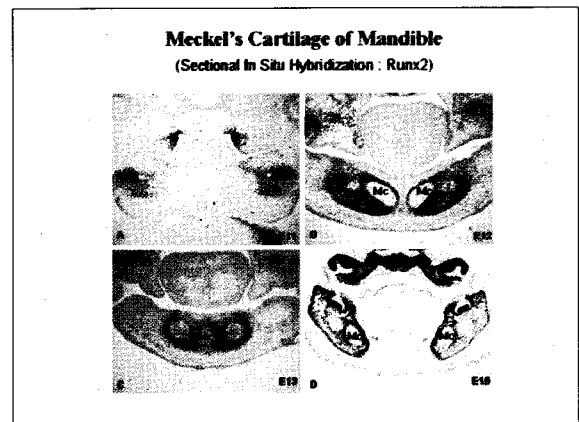


Fig. 9

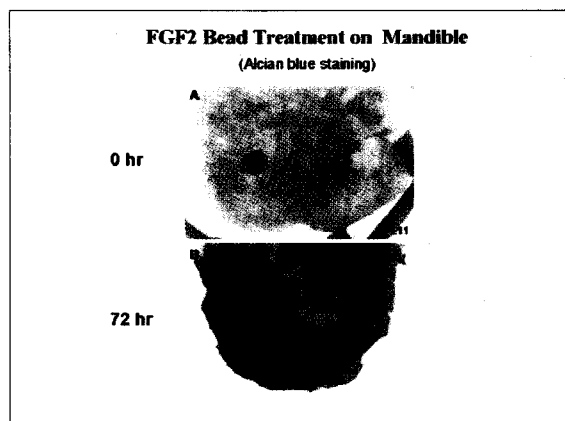


Fig. 10

## Abstract

THE EFFECT OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR SIGNALING ON  
CARTILAGE FORMATION

Choong-Je Park, Sang-Won Lee\*, Soon-Hyun Nam, Young-Jin Kim,  
Hyun-Mo Ryoo\*, Hyun-Jung Kim

*Department of Pediatric Dentistry and Biochemistry\*, College of Dentistry,  
Kyungpook National University*

Fibroblast growth factor (FGF) / FGF receptor (FGFR) mediated signaling is required for skeletogenesis including intramembranous and endochondral ossifications. Runx2 (Cbfa1/Pebp2 $\alpha$ A/AML3) is an essential transcription factor for osteoblast differentiation and bone formation. Murine calvaria and mandible are concurrently undergoing both intramembranous bone and cartilage formations in the early developmental stage. However the mechanism by which these cartilage formations are regulated remains unclear. To elucidate the effect of FGF signaling on development of cranial sutural cartilage and Meckel's cartilage and to understand the role of Runx2 in these processes, we have done both in vivo and in vitro experiments. Alcian blue staining showed that cartilage formation in sagittal suture begins from embryonic stage 16 (E16), Meckel's cartilage formation in mandible from E12. We analyzed by in situ hybridization the characteristics of cartilage cells that type II collagen, not type X collagen, was expressed in sagittal sutural cartilage and Meckel's cartilage. In addition, Runx2 was not expressed in Meckel's cartilage as well as sagittal sutural cartilage, except specific expression pattern

only surrounding both cartilages. FGF signaling pathway was further examined in vitro. Beads soaked in FGF2 placed on the sagittal suture and mandible inhibited both sutural and Meckel's cartilage formations. We next examined whether Runx2 gene lies in FGF signaling pathway during regulation of cartilage formation. Beads soaked in FGF2 on sagittal suture induced Runx2 gene expression.

These results suggest that FGF signaling inhibits formations of sagittal sutural and Meckel's cartilages, also propose that FGF signaling is involved in the proliferation and differentiation of chondroblasts through regulating the transcription factor Runx2.

**Key words** : FGF signaling, Runx2, Cranial suture, Meckel's cartilage, Chondrogenesis