대 한 류 마 티 스 학 회 지
Vol. 15, No. 1, March, 2008

□ 종 설 □

골의 형성에 관여하는 세포내 신호전달체계와 전사인자

동국대학교 일산병원 정형외과학교실

임 군 일

= Abstract =

Intracellular Signal Transduction Pathways and Transcription Factors for Osteogenesis

Gun-Il Im, M.D.

Department of Orthopaedics, DongGuk University International Hospital, Dongguk University College of Medicine, Seoul, Korea

Osteoblastic differentiations of mesenchymal stem cells are controlled by a number of intracellular signal transduction systems and transcription factors. These systems and factors interacts with and cross-talks to one another to complete the process of bone formation. Discovery of these systems has been enabled by gene-targeting techniques. In this brief review, the signal transduction pathways and transcription factors of importance to osteoblastic differentiation are introduced.

Key Words: Signal transduction pathway, Transcription factor, Osteogenesis, Bone

골은 발생에 있어 간엽줄기세포로부터 골모세포로의 분화가 연골내골화와 막내골화라는 두 과정을 거쳐 일어나면서 골모세포에서 만들어진 기질에 무기질이 침착되어 생성된다. 성체가 된 다음에도 골절 등 다른 요인이 있을 때 골수, 골막 및 근육에 존재하는 간엽줄기세포가 다시 동원되면서 유사한 과정이 일어나게 난다. 최근에 분자생물학적및 유전학적 접근법이 많이 발전하였고 특히 생쥐에서 유전자 표적기술(gene targeting)을 이용한 연구를 통하여 골형성에 관여하는 신호전달체계와 전사인자의 존재 및 역할이 밝혀졌다.

근골격계의 발생에 관여하는 중요한 신호전달체계

＜접수일 : 2007년 11월 9일, 심사통과일 : 2008년 2월 13일＞

※통신저자 : 임 군 일
경기도 고양시 일산구 식사동 814번지
동국대학교 일산병원 정형외과
Tel : 031) 961-7315, Fax : 031) 961-7314 E-mail : gunil@duih.org

이 연구는 보건복지부 지원 근골격계 바이오장기센터(Musculoskeletal Bioorgan Center)로부터 지원받아 이루어짐.

는 크게 TGF (transforming growth factor)-β/BMP (bone morphogenetic proten), Wnt/β-catenin, FGF (fibroblast growth factor), Hedgehog, Notch 등을 들 수 있다. 이들은 각자 특정한 역할이 있으며 서로 상호작용을 하면서 골형성을 조절한다. 골형성에 관계하는 전사인자는 여러 가지가 알려져 있으나 가장 많이 연구되었고 중요한 전사인자는 Runx2/Cbfa1/OSF2 와 osterix이다.

본고에서는 골의 형성에 관여하는 신호전달체계와 전사인자에 관하여 현재까지 알려진 지견을 요약하고자 한다.

골의 형성에 관여하는 신호전달체계

1. Wnt/β-catenin 경로

Wnt는 지질이 결합된 여러 당단백의 그룹으로서 세포운명의 결정, 극성, 분화, 이동 등 여러 현상에 관여하며 발생에 있어 체간과 사지의 축형성에 중요한 신호를 보내는 작용이 있다. 그 어원은 초파리의 극성(polarity)과 변태를 결정하는 wingless 유전자과 척추동물에서 유사구조를 가진 INT 유전자에서 유래한 합성어이다. Wnt는 19종류가 알려져 있고 세포막에 frizzled (FZD)라고 하는 수용체를 가지는데 FDZ는 구조상 세포막을 7번 통과하여 걸치는 모양을 가지고 있다 (1). 사람에서는 발암기전과 관계되어 먼저 연구되기 시작하였다.

Wnt의 신호가 세포 내에서 전달되는 기전에는 표준경로(canonical pathway)와 비표준 경로(noncanonical pathway)의 두 경로가 있으나 표준 경로만이 골형성에 관계된다 (2,3). 이 경로의 활성화는 β-catenin의 핵내 이동여부에 의하여 결정된다(그림 1). 먼저 세포 밖에서 Wnt가 수용체인 FZD와 결합하면 이들이 다시 LRP5/6 이라는 세포막단백을 끌어 당겨 복합체를 형성하고 이 복합체가 다시 세포 내에서 dishevel (DSH)이라는 단백과 와 결합하면서 β-catenin을 인산화하여 분해하는 glycogen synthase kinase (GSK3) adenomatosis polyposis coli (APC)-Axin 복합체에서 Axin을 유리시켜 β-catenin의 분해를 막아 결과적으로 세포질내 β-catenin의 농도를 높인다. 세포질내에서 안정화된 β-catenin은 핵내로 이동하여 핵내의 전사인자인 lymphoid enhancer-

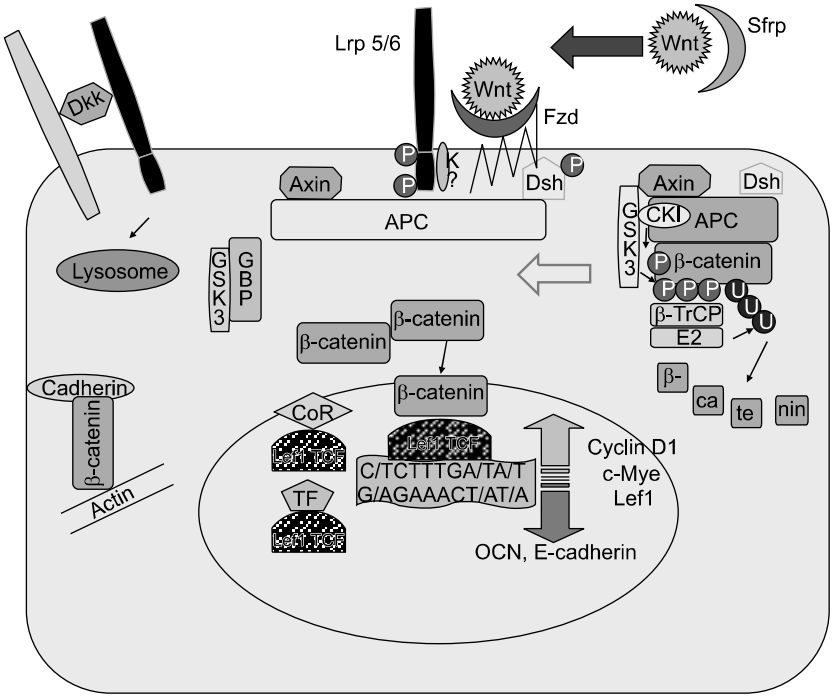


Fig. 1. Canonical pathway of Wnt signaling.

binding factor (Lef/Tcf)와 결합하여 표적 유전자들인 cyclin D, c-myc의 전사를 촉진하게 된다 (4,5). Wnt는 골형성의 master regulator인 Runx2 전사인자의 발현을 직접 증가시키고 Lef/Tcf가 Runx2와 작용하여 활성도를 증가시키는 기전이 있는 것이 있는 것으로 생각되며 연골형성의 master regulator인 Sox-9과 직접 결합하여 분해되게 함으로서 Sox-9의 작용을 억제시킨다.

세포외에서 Wnt의 작용을 조절하는 물질로서 secreted FZD-related protein (sFRP)와 Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1)이 있는데 이들은 Wnt와 결합하여 Wnt가 세포막의 FZD에 결합하지 못하는 작용을 한다. 공동수용체인 LRP5/6에 결합하여 Wnt 경로의 활성화를 막는 물질로서는 SOST (slerostosis gene product), DKK (Dickkopf) 단백 등이 있다 (6,7).

Wnt는 태아발생에 있어서 골격의 발생과 형성, 성인에 있어 골격의 재형성에 관여하지만 잉여기능의 문제, 다른 신호전달체계와의 상호작용관계, 시기에 장소에 따라 상반된 작용을 갖는 복잡한 기전을 가지고 있다 (8-10). 골량과 Wnt 체계와의 관계는 동조 수용체인 LRP5의 변이가 사람의 골량을 변화시킨다는 연구에서부터 주목받기 시작하였다 (11-14). LRP의 기능이 증가되는 변이에서는 골량이 증가하는데 이는 β-catenin에 의한 효과에 의한다 (15). 최근 발생과정의 연구에 따르면 Wnt/β-catenin 신호체계는 미분화된 간엽줄기세포에서 골모세포로의 분화를 촉진하고 연골세포로의 분화를 억제하는 자율기전을 구성하며 또한 파골세포의 억제물질인 osteoprotegerin의 분비를 촉진시킨다 (16-18). 발생과정에서 β-catenin이 knockout 되는 경우 골대신 연골이 형성되고 이때 Runx2는 계속 발현되나 Osterix가 발현되지 않은 것으로 보아 Wnt가 간엽줄기세포에 골이나 연골로 분화하는 과정에서 아직 운명이 결정되지 않은 골연골전구세포(osteochondroprogenitor cell)을 골모세포로 유도하는 작용이 있는 것으로 생각된다 (19,20). β-catenin의 작용이 증강된 변이의 경우 골경화증(osteopetrosis)가 유발되는데 이는 osteoprotegerin의 과잉생성에 의하여 파골세포의 작용이 억제된 결과로 생각된다 (17).

2. TGF-β/BMP 경로

TGF-β는 처음에 쥐의 신장에서 배양한 섬유모세포의 부착에 의한 성장을 촉진하는 성장인자로 알려졌으나 그 이후 유전학적, 분자생물학적 연구에 의하여 많은 수의 연관된 물질이 알려졌다 (21). TGF-β의 대그룹(superfamily)에 속하는 성장인자들은 여러 종에서 보존된 염기배열과 구조적인 특성을 공유하며 사람에서는 약 30종이 알려져 있다 (22,23). 이들은 크게 TGF-β, BMP, activin/inhibin group으로 나뉘며 구조적으로 유사하나 결국은 서로 다른 작용을 유도하는 수용체들에 결합하여 세포내 신호전달을 한다 (24). 이 인자들은 2개의 type I 수용체와 serine/theronine kinase의 기능을 가진 2개의 type II 수용체에 결합하여 세포내 작용을 유도하게 된다 (25,26). TGF-β와 BMP는 서로 다른 type I receptor에 작용하게 된다. BMP는 BMPR-IA, BMPR-IB (activin receptor-like kinase 3,6) TGF-β는 TGFR-I (activine receptor-like kinase 5)에 결합하게 되고 이 수용체들은 세포내에서 서로 다른 신호전달물질을 사용하게 되어 다른 작용을 보이게 된다 (24). BMP나 TGF-β가 수용체에 결합하면 type II 수용체가 type I 수용체를 인산화시키며 type I 수용체는 R-Smad (receptor-regulated Smad)를 활성화시키고 R-Smad는 Co-Smad라는 물질과 결합하여 세포내로 이동하여 표적 유전자을 전사하게 된다 (그림 2) (26). BMP는 R-Smad 중에서 Smad 1,5,8을 TGF-β는 Smad 2,3을 이용하며 Co-Smad는 Smad 4 한 종류만이 존재한다 (24). Smad를 통한 표준 경로 이외에도 BMP에 의한 신호는 mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로를 활성화시키고 다시 Smad를 인산화시켜 골형성에 대한 BMP의 작용을 중개하게 된다 (27). BMP의 표적 유전자중 가장 중요하고 많은 형태의 세포에서 관찰되는 것은 Id (inhibitor of differentiation) 단백인데 (28) 이물질은 간엽줄기세포를 근육으로 분화를 유도하는 MyoD, 신경으로 분화유도하는 NeuroD, Mash1 등의 HLH (helix-loop-helix) 전사인자에 결합하여 그 작용을 방해함으로서 세포의 분화를 막고 세포의 증식을 유도한다 (29,30). Smad 자체가 골모세포 분화의 전사인자인 Runx2의 합성을 유도하지는 않지만 Smad1,5는 Runx2와 직접 상호작용하여 Runx2의 활성을 높이고

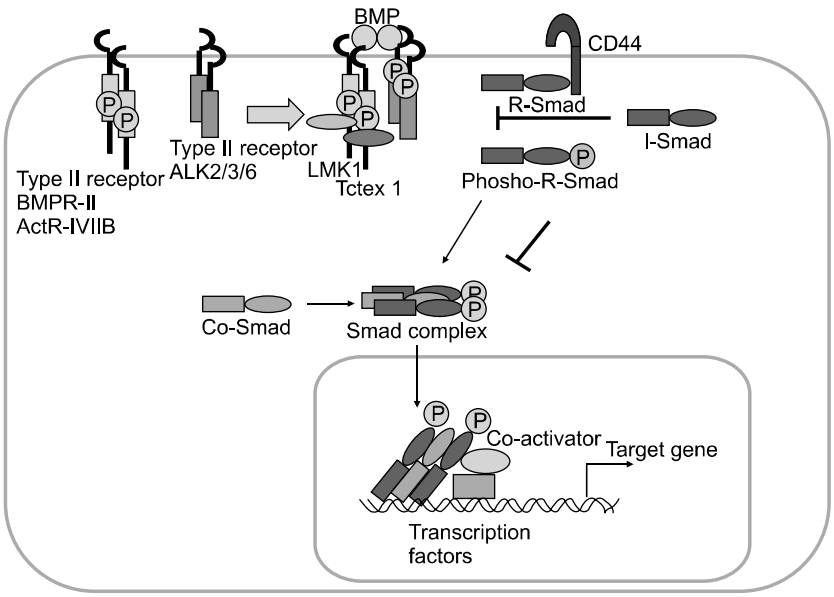


Fig. 2. Intracellular signal transduction pathway of BMP signaling.

Smad에 의하여 발현되는 Dlx5가 역시 Runx2의 작용을 강화시켜 골형성을 촉진하게 된다 (31). BMP는 이소성으로 골형성을 하는 특징으로 명명되었으나 이들의 더욱 중요한 역할은 개체발생에서 세포의 증식, 분화, 이동을 조절하여 장기발생을 유도하는 것이라고 볼수 있다. BMP 중에서 BMP2, BMP4, BMP7이 강력한 골유도인자로서의 작용이 있는 것으로 알려져 있다.

3. FGF 경로

섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor)는 배양된 섬유모세포의 증식을 유도하는 인자로 처음 알려졌으며 22종이 알려져 있는데 tyrosine kinase의 역할을 하는 4개의 수용체(FGFR1～4)를 통하여 작용한다 (32,33). FGF는 세포표면의 heparan sulfate proteoglycan (HSPG)에도 결합하는데 이 물질은 그 자체가 신호전달작용은 없으나 FGF가 수용체에 결합하는 것을 조절한다. FGF는 세포의 증식, 분화, 이동 등 여러 단계에 작용하는데 세포의 종류 및 분화단계에 따라 상반된 작용을 가지고 있다 (34-38). FGF는 미분화된 간엽줄기세포의 증식을 촉진시키지만 골단판의 연골세포에는 반대로 증식억제작용이 있다 (33). 수용체 중 하나인 FGFR3은 연골세포성장의 가장 중요한 억제인자(master inhibitor)이다. 대표적인 소인증인 achondroplasia에서는 FGFR3의 기능항진 변이("gain of function" mutation)로 인하여 연골세포의 증식이 억제되어 연골내골화가 진행하지 못함으로서 발달장애가 초래된다 (33,39). FGFR에 의하여 중개되는 작용은 STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) 경로에 의한 증식억제작용과 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성화에 의한 성숙의 억제작용이다 (33).

인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor)는 골에서 흔히 발견되는 성장인자 중 하나이며 골형성에 중요한 역할을 한다. 수용체에 결합시 내재한 tyrosine kinase가 활성화되며 Ras/MAPK 경로와 phosphatidyl inositol 3 kinase pathway라는 2개의 경로가 활성화되는데 전자는 세포의 증식을 후자는 세포사멸의 방지를 유도하는 작용이 있다.

4. Hedgehog 경로

Hedgehog 단백은 무척추동물, 척추동물에 있어서 모두 발달과정에서 중요한 역할을 하는 물질로서 척추동물에는 Desert Hedge Hog (DHH), Sonic Hedge

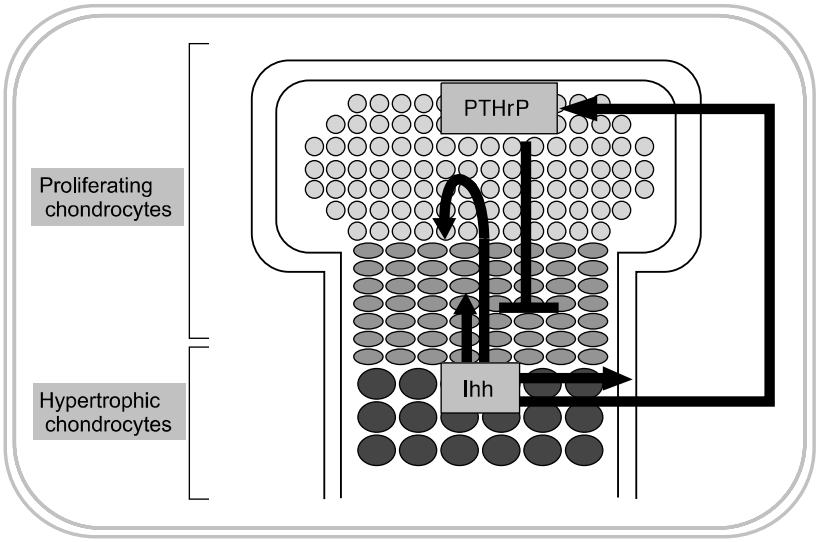


Fig. 3. IHH/PTHrP negative feedback loop in growth plate.

Hog (SHH), Indian Hedge Hog (IHH)의 3가지 종류가 있다 (40). DHH는 말초신경과 정자생성에 SHH는 몸의 축 형성과 신경계발달에 역할을 하고 IHH는 연골내골형성(endochondral ossification)의 주 조절자 (master regulator)의 역할을 한다 (40). 사람에 있어 IHH의 결핍시는 사지의 길이가 짧아지는 단지증(brachydactyly)형태의 골격변형이 유도된다. IHH는 골단판에서 비후전연골세포(prehypertrophic chondrocyte)에서 생성되어 관절연골주위(periarticular chondrocyte)에서 PTHrP (parathyroid hormone related peptide)의 생성을 촉진하는데 PTHrP는 연골세포의 증식을 촉진하며 연골세포의 비후를 막아 IHH의 생성을 억제하는 negative feedback loop를 이룬다(그림 3). IHH는 PTHrP를 통하는 경로 이외에도 직접 연골세포에서 세포주기를 조절하는 cyclin D1의 발현을 통하여 증식을 유도하는 작용도 가지고 있으며 연골막(perichondrium)에서 Runx2의 발현을 유도하여 골화를 유도한다. 골단판에서 Runx2와 BMP2, ERK (extracellular signal related kinase), 1/2, p38 MAPK가 모두 IHH의 생성을 촉진시키는데 작용한다. FGF는 연골판에서 IHH의 생성을 억제하나 그 작용기전에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. PTHrP는 연골, 심장, 신장, 모낭, 유방 등 많은 태아 및 성인의 조직에서 생산되며 PTHrP/PTH 수용체에 결합하여 작용하는데 이 수용체는 PTH의 내분비 기능 및 PTHrP의 자가분비/측분비 기능을 모두 중개한다고 볼 수 있다. 이 수용체는 세포내에서 cAMP/PKA 경로의 활성화를 통하여 작용하게 된다. 그 결과로 cyclin D1이 활성화되어 연골세포가 증식되고 Sox-9에 의하여 연골세포의 표현형이 유지된다.

5. Notch 경로

Notch는 변이 시 초파리의 날개의 과잉성장을 유도하여 날개의 홈을 만드는 유전자에서 유래한 이름이며 다세포동물에서 세포간의 빠른 신호전달과 증폭을 목적으로 하는 신호체계이다 (41,42). 세포에 부착된 Delta 또는 Serrate ligand를 통하여 세포와 세포의 접촉에 의한 신호를 보내게 된다. 이 신호는 Notch 수용체의 세포내 영역(intercellular domain of notch receptor, NICD)이 분리되면서 핵으로 이동하여 전사조절인자인 CSL을 활성화시켜서 표적 유전자인 HES (Hairy/Enhancer of split) 또는 HES-related peptide를 활성화시키게 된다 (43). Notch 신호전달체계의 가장 중요한 기능은 세포의 분화억제인데 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)에서 Wnt와 함께 stemness를 유지하는 역할을 한다 (44). Notch 신호는 간엽줄기세포의 근육이나 신경계통으로 분화는 막지만 골모세포로의 분화는 촉진시키며 BMP 신호체계와의 상승작용도 있는 것으로 생각되고 있다 (43). 골의 발생에 있

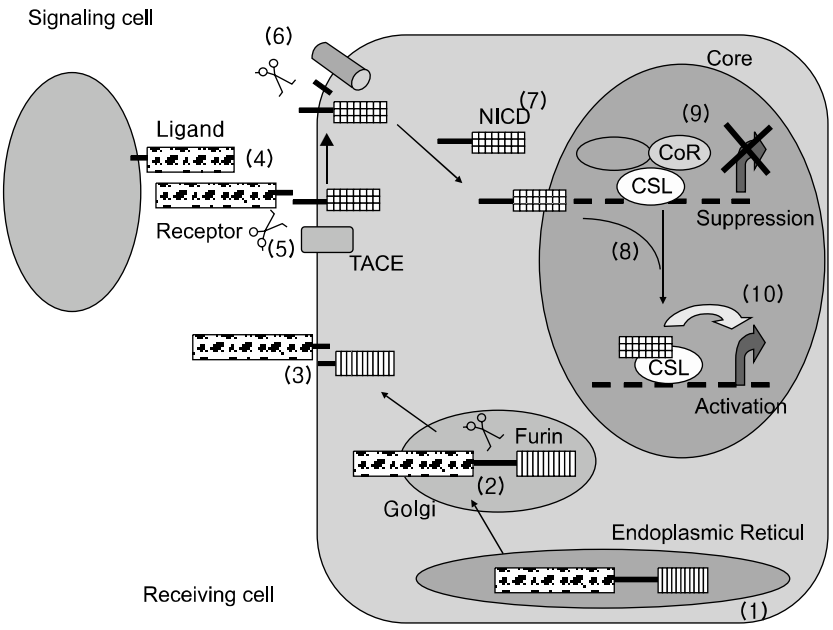


Fig. 4. Intracellular signal transduction pathway of Notch.

어 간엽응축 단계(mesenchymal condensation)와 비후연골에서 발현되며 배양된 골모세포의 전구세포에서도 발현된다(그림 4) (45,46).

골모세포의 분화과정에 관여하는 전사인자

1. Runx2

Runx는 초파리의 runt 유전자와 유사한 DNA 결합 영역을 가진 전사인자로서 Runx1/Cbfa2, Runx2/Cbfa1, Runx3/Cbfa3 등 3개 전사인자가 한 군을 이룬다. Runx는 동조 전사인자인 core binding factor β와 함께 이중체를 이루어 작용한다. Runx1은 조혈세포의 분화에 Runx2는 골모세포로의 분화에 Runx3는 위장관 상피세포의 성장과 신경계발달에 필수적인 역할을 한다 (31). Runx2는 core binding factor 1 (Cbfa1) 또는 osteoblast specific factor (OSF) 2라고도 하며 골형성에 있어 필요불가결한 인자이다 (46). Runx2의 유전자가 knockout 된 쥐의 경우 연골내골화와 막내골화가 모두 일어나지 않아 태아는 개체발생중에 사망하게 된다 (47). 하나의 대립형질(allele)이 knockout 된 이형변이(heterozygous mutation)의 경우 쇄골두개이골증(cleidocranial dysostosis)가 발생한다 (46). 간엽줄기세포에서 Runx2를 knockout시킨 경우 지방세포로의 분화하고 여기에 BMP를 처리한 경우 연골세포로 분화하지만 골모세포로의 분화는 일어나지 않는다 (48).

간엽줄기세포에서 Wnt와 BMP 등 여러 경로를 통하여 도달한 분화유도신호는 master switch 역할을 하는 Runx2에 전달되고 Runx2는 골모세포의 표지자 역할을 하는 type I collagen, osteopontine, bone sialoprotein, osteocalcin 등 여러 유전자의 전사를 유도한다 (31). Runx2의 중요한 역할중 다른 하나는 빠르게 증식하던 전구세포들의 분열을 억제하여 성장쪽에서 분화쪽으로 세포의 운명을 바꾼다. 성장판의 연골세포에서는 연골세포의 비후를 유도하고 골모세포로의 분화를 유도하는 역할을 한다 (49).

Runx2는 골모세포의 분화과정에서 항상 높은 정도로 발현되며 여러 전사인자들이 결합하여 그 작용을 항진하거나 억제한다(그림 5).

2. Osterix

Zinc finger를 가진 DNA 결합단백으로서 골형성에 있어 Runx2보다 아래단계에서 작용하는 것으로 알려져 있다 (50). Osterix (Osx)를 knock-out 시킨 경우

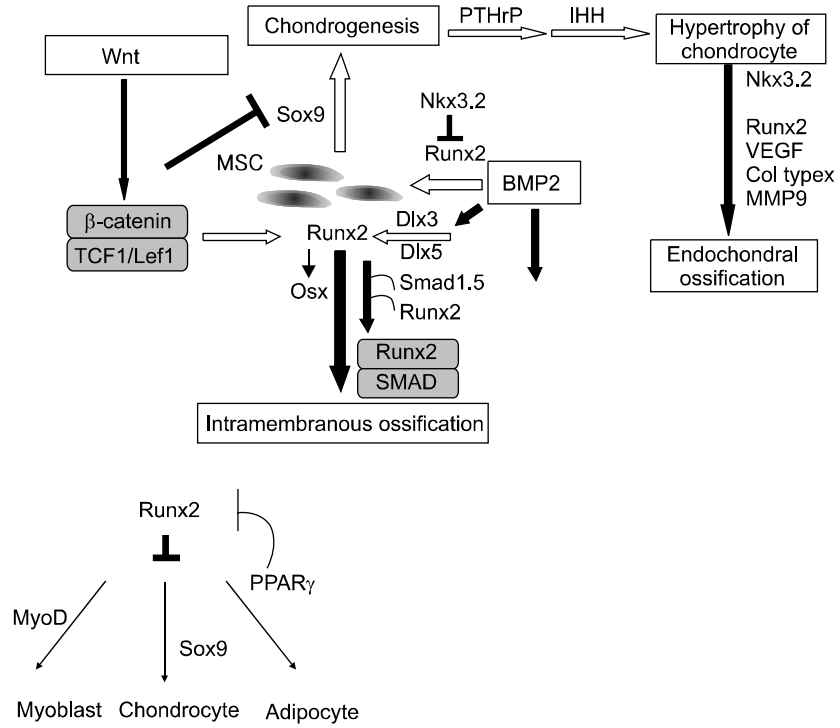


Fig. 5. Run-2 acting as molecular switch in osteogenesis.

간엽줄기세포로부터 골모세포의 분화가 억제되어 SOX9과 collagen type II 등 연골형성의 표지자를 지닌 세포로 분화한다. 따라서 Osx가 없는 경우 연골내골화와 막내골화가 모두 일어나지 않는다 (51). 현재까지 알려진 바로는 Runx2와 물리적인 상호작용하지 않으며 BMP-2에 의한 Osx의 유도에 Runx2가 필요하기는 하나 충분하지는 않은 것으로 알려져 있다. Runx2는 Osx의 발현을 직접 활성화시킨다. Runx2가 전구세포(osteoprogenitor)의 증식을 억제하는 작용이 있다는 반면 Osx는 증식을 촉진시킨다 (52,53). NFTAc1는 Osx와 결합하여 작용하는 인자로 Osx에 의하여 조절되는 유전자들을 활성화시킨다 (54).

3. 골형성에 관여하는 다른 전사인자

초기 발생과정에서 BMP는 여러 homodomain protein (HD)을 상승시켜 간엽세포의 성장및 분화에 관여한다. 성인골격에서도 Ms2 (*meshless* family member)와 Dlx (distalless related homodomain)3, 5가 골모세포인자의 중요한 조절물질로 작용하는데 (55-58), 이들은 동일한 DNA의 조절 모티프에 결합하여 작용하여 다양한 작용을 하게 된다. Msx2는 골모세포의 분화를 세포의 표현형과 표적유전자에 따라 억제하기도 하고 촉진하기도 하는데 MSX가 knockout 되는 경우 두개골형성에 장애를 보이게 된다 (59-63). Dlx3과 Dlx5는 Runx2와 osteocalcin 유전자의 발현을 촉진한다. Twist는 Runx2와 상호작용하여 골모세포의 분화를 억제하며 이 유전자가 발현되지 않은 경우 두개골 봉합의 조기봉합이 유도된다. Menin 역시 Runx2와 작용하여 활성을 감소시키고 STAT1은 세포질내에 Runx2를 격리시켜 작용을 억제하는 작용이 있다. AP1 (activator protein 1 : FOS/JUN)은 역시 골형성에 중요한 역할을 하며 과잉발현되는 경우 골모세포의 수가 증가하고 지방세포로의 분화가 감소하게 된다 (64-67). 그 외의 전사인자로서 activating transcription factor 4, krox-20 등의 인자가 알려져 있는데 ATF4는 골모세포의 분화과정에서 늦은 단계에서 작용하는 것으로 생각되는데 이 유전자가 없는 경우 무기질침착이 늦어지고 골의 양이 감소한다 (68).

결 론

간엽줄기세포부터 골의 형성에 있어 분자적 기전이 많이 연구되어 밝혀지고 있다. 신호전달체계에 있어서는 특히 Wnt/β-catenin 경로와 TGF-β/BMP 경로가 가장 중요한 역할을 하며 전사인자로는 Runx2가 각종 신호가 모이는 중심축 역할을 하고 있다고 볼 수 있다.

이러한 지식들은 여러 유전 질환 및 퇴행성질환의 치료, 조직재생에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1) Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. Dec Cell 2003;5:367-77.
2) Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene 2004;341:19-39.
3) Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signaling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. Expert Opin Ther Targets 2005;9:1063-77.
4) Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 2004;20:781-810.
5) Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and beta-catenin signaling: diseases and therapies. Nat Rev Genet 2004;5:691-701.
6) Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. J Biol Chem 2005;280:26770-5.
7) Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling. Nature 2002;417:664-7.
8) Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, et al. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. Cell 2003;115:151-62.
9) Yamaguchi TP, Bradley PA, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. Development 1999;126:1211-23.
10) Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. Development 2003; 130:1003-15.
11) Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell 2001;107:513-23.
12) Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signalin. Mol Cell Biol 2005; 25:4946-55.
13) Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med 2002;346:1513-21.
14) Van Wesenbeek L, Cleiren LE, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. Am J Hum Genet 2003;72:763-71.
15) Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, et al. Cbfal-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol 2002;157:303-14.
16) Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, et al. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. Bone 2005; 36:585-98.
17) Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt dignaling in differentiated osteoblasts controls osteoblast differentiation. Dev Cell 2005;8:751-64.
18) Henriksen K, Gram J, Hoegh-Andersen, Jemtland R, Ueland T, Dziegkel MH, et al. Osteoblast from patients with autosomal dominant osteopetrosis type I caused by a T253I mutation in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 are normal in vitro, but have decreased resorption capacity in vivo. Am J Pathol 2005;167:1341-8.
19) Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell 2005;8: 739-50.
20) Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chon-

drocytes. Dev Cell 2005;8:727-38.
21) Kluppel M, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Frontiers in molecular biology: protein kinase funtions. 1st ed. p. 303-40, Oxford, Oxford University Press, 2000.
22) Herpin A, Lelong C, Favrel P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. Dev Comp Immunol 2004;28:461-85.
23) Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcrption factors. Genes Dev 2005;19:2783-810.
24) Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:251-63.
25) Shi Y, Massague J. Mechanism of TGF-B signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003;113: 685-700.
26) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature 1998;390:465-71.
27) Deynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-β signaling in tumor supperssion and cancer progression. Nat Genet 2001;29:117-29.
28) Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene. Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast like cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:9219-22.
29) Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. J Cell Physiol 2002;190:21-8.
30) Rawls A, Olson EN. MyoD meets its maker. Cell 1997;89:5-8.
31) Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. J Cell Biochem 2005;95:445-53.
32) Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature 1974;249:123-7.
33) Eswarakumar VP, Las I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor 2005;16:139-49.
34) Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. Cell 1991;64:841-8.
35) Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. Science 1991;252:1705-8.
36) Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is requirement for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. Mol Cell Biol 1992;12:240-7.
37) Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikie I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, et al. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. Cell 1994;79:1015-24.
38) Lin X, Buff EM, Perrimon N, Michelson AM. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development. Development 1999;126:3715-23.
39) Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. Cell 1996;84:911-21.
40) Lick PL, Jane M. Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development. J Cell Biochem 2005;96:1163-73.
41) Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Visan I, Guidos CJ. Notch signaling in development and disease. Clin Genet 2003;64:461-72.
42) Baron M. An overview of the Notch signaling pathway. Semin Cell Dev Biol 2003;14:113-9.
43) Michael K, Jeffery LW. Turning it up a Notch: cross-talk between TGFβ and Notch signaling. BioAssays 2005;27:115-8.
44) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003;425:841-6.
45) Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, Miyatani S, Morimura N, Yasuda M, et al. Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. J Bone Miner Metab 2003;21: 344-52.
46) Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Xin C, Moriishi T, Sakano S, et al. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. J Biol Chem 2005;280:15842-8.
47) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfal results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 1997;89: 755-64.
48) Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori

T. Multilineage differentiation of Cbfaldeficient calvarial cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:630-6.
49) Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem 2006;99:1233-9.
50) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002;108:17-29.
51) Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. Gene 2006;372:62-70.
52) Kim YJ, Kim HN, Park EK, Lee BH, Ryoo HM, Kim SY, et al. The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. Gene 2006;366:145-51.
53) Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, et al. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of pre-osteoblasts. Cancer Res 2003;63:5357-62.
54) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. J Exp Med 2005;202:1261-9.
55) Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, et al. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. Dev Biol 1999;209:298-307.
56) Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. Biochem Biophys Res Commun 2003;309:689-94.
57) Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. J Biol Chem 2003;278: 34387-94.
58) Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, et al. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. Mol Cell Biol 2004;24:9248-61.
59) Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, et al. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. J Biol Chem 2004;279:34015-22.
60) Yoshizawa T, Takizawa F, Iizawa F, Ishibashi O, Kawashima H, Matsuda A, et al. Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. Mol Cell Biol 2004;24:3460-72.
61) Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. J Biol Chem 2003;278: 45969-77.
62) Tadic T, Dodig M, Erceg I, Marijanovic I, Mina M, Kalajzic Z, et al. Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation. J Bone Miner Res 2002;17:1008-14.
63) Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, Kim JI, Kim BG, Hwang YS, et al. Dlx5 specifically regulates Runx2-II expression by binding to homeodomain response elements in the Runx2 distal promoter. J Biol Chem 2005;280:35579-87.
64) Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. J Biol Chem 2005;280:30689-96.
65) Gutierrez S, Javed A, Tennant D, van Rees M, Montecino M, Stein GS, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) b and d Activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. J Biol Chem 2002;277:1316-23.
66) McCarthy TL, Ji C, Chen Y, Kim KK, Imagawa M, Ito Y, et al. Runt domain factor (Runx)-dependent effects on CCAAT/ enhancer-binding protein delta expression and activity in osteoblasts. J Biol Chem 2000;275:21746-53.
67) Selvamurugan N, Chou WY, Pearman AT, Pulumati MR, Partridge NC. Parathyroid hormone regulates the rat collagenase-3 promoter in osteoblastic cells through the cooperative interaction of the activator protein-1 site and the runt domain binding sequence. J Biol Chem 1998;273:10647-57.
68) Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. Cell 2004;117: 387-98.