

## 치아와 골형성에서의 Runx2와 Osterix의 기능

김 정 은

경북대학교 의학전문대학원 분자의학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:381-385)

## FUNCTION OF RUNX2 AND OSTERIX IN OSTEOGENESIS AND TEETH

Jung-Eun Kim

*Dept. of Molecular Medicine, Kyungpook National University School of Medicine*

Bone is a dynamic organ that bone remodeling occurs throughout life and involves the process in which the bone matrix is broken down through resorption by osteoclasts and then built back again through bone formation by osteoblasts. Usually these two processes balance each other and a stable level of bone mass is maintained. We here discuss transcription factors involved in regulating the osteoblast differentiation pathway. Runx2 is a transcription factor which is essential in skeletal development by regulating osteoblast differentiation and chondrocyte maturation. Its companion subunit, Cbfb is needed for an early step in osteoblast differentiation pathway. Whereas Osterix (Osx) is a new identified osteoblast-specific transcription factor which is required for the differentiation of preosteoblasts into more mature and functional osteoblasts. We also discuss other transcription factors, Msx1 and 2, Dlx5 and 6, Twist, and Sp3 that affect skeletal patterning and development. Understanding the characteristics of mice in which these transcription factors are inactivated should help define their role in bone physiology and pathology of bone defects.

**Key words:** Bone remodeling, Osteoblast, Runx2, Osterix

## I. 서 론

척추동물의 골형성은 막성(intramembranous)과 연골성(endochondral) 골형성의 두 가지 다른 발생과정을 통해서 일어난다<sup>1)</sup>. 막성 골형성 과정은 대부분의 두개골 및 안면골에서 발생하고, 간엽세포 집괴(mesenchymal condensation)에서 조골세포가 직접적으로 분화하는 형태이다. 반면에 연골성 골형성 과정은 사지와 두개골의 일부, 척추, 늑골 등에서 발생하고 연골 원형에서 출발하여 나중에 골격요소의 형태를 갖추게 되고 이들의 발생을 조절해서 최종적으로 골격을 형성하게 되는 형태이다. 두 경우 모두에서 조골세포는 특징적인 세포외기질을 생성하고 골기질의 석회화에 중요한 역할을 담당하게 되며, 석회화된 골기질은 골격에 힘을 주고 미네랄과 여러 성장요소의 저

장고 역할을 한다. 또한 조골세포는 뼈를 흡수하는 세포인 파골세포 분화에 관여하고 직접적으로 칼슘 침착을 조절함으로써 혈액에서 칼슘의 항상성을 유지하게 되고 동시에 파골세포에 의한 칼슘 유출을 조절하는 역할을 한다. 이러한 조골세포와 파골세포에 의한 뼈의 재생 과정은 척추동물이 살아가는 동안 계속 유지된다.

골형성 과정의 분화시기에 따라 특별하고 다양한 표지자(marker)가 존재한다. Type I 콜라겐(Col1a1)과 alkaline phosphatase는 골분화 초기단계 표지자이고 osteocalcin과 세포외기질의 석회화는 분화말기의 중요한 표지자이다. 신호전달 분자들 중에 TGF- $\beta$ , BMP, FGFs, Wnt family 등은 배아발생 과정동안 골격구조 패턴을 형성하는데 중요한 역할을 한다<sup>2)</sup>. 최근에는 골대사에 있어서 leptin 신호전달의 중요성이 보고되었고<sup>3)</sup>, 세포외기질의 구성물질이 연골과 골세포의 표현형이나 기관 형성을 조절하고 유지하는데 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다<sup>4)</sup>. 이러한 최근 보고들은 조골세포 분화과정을 이해하고 분화과정에 필요한 전사인자들을 연구하는데 새로운 면을 보여주고 있다. 본 논문에서는 치아와 골형성에 관련하여 세포 분화 조절에 중요한 전사인자들의 특성을 유전자 조작 동물의 연구결과를 중심으로 설명하고자 한다.

**김 정 은**

700-422 대구광역시 중구 동인2가 101번지

경북대학교 의과대학

**Jung-Eun Kim***Dept. of Molecular Medicine, Kyungpook National Univ. School of Medicine*

101 Dongin-dong, Jung-gu, Daegu, 700-422, Korea

Tel: 82-53-420-4949 Fax: 82-53-426-4944

E-mail: kjeum@knu.ac.kr

\* 이 논문은 2005년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2005-204-E00006). 또한 이 논문은 2007년도 두뇌한국 21사업에 의하여 지원되었음.

## II. 본 론

### 1. Runx2

#### 1.1. Runx2와 Cbfb

Runx2는 조골세포 분화와 골형성에 가장 필수적인 전사인자로 잘 알려져 있다. 생쥐에서 Runx2는 태생기 9.5일에 척색에서 발현하기 시작해서 이후 prechondrogenic mesenchymal condensations과 연골세포에서 발현한다. 태생기 13.5일에 연골막과 골막에서 발현하고 비대성 연골세포로 그 발현이 이어지며 최종적으로 연골성 골형성과 막성 골형성 과정 동안 형성되는 모든 뼈의 조골세포에서 아주 높게 발현한다<sup>9</sup>. 조골세포뿐만 아니라 연골세포와 비대성 연골세포에서도 강하게 발현하는 Runx2는 조골세포 분화뿐만 아니라 비대성 연골세포 분화에도 관여한다. 또한 Runx2는 치아형성의 후기단계에 필수적이고 석회화된 치아조직의 발달에 상당히 관여하며 치판(dental lamina) 증식에 영향을 끼친다고 알려져 있다<sup>6</sup>. 그러므로 Runx2는 치아와 골형성 과정에 있어서 중요한 전사인자라 할 수 있다. Runx2의 파트너 단백질인 Cbfb는 DNA에 직접적으로 결합하지는 않지만 Runx family에 존재하는 DNA 결합도메인인 runt 단백질에 DNA 결합을 증가시켜준다<sup>7</sup>. Cbfb는 또한 급성 백혈병에서 염색체의 위치변경(translocation)에 관여하고 태아의 간에서 Runx1 의존적인 조혈과정에 필수적인 인자로 알려져 있다. 이러한 Cbfb는 배아발생과정 동안 Runx2 의존적인 골형성에 절대적으로 필요하지만 출생이후 치아나 골형성에 있어서의 기능은 알려진 바가 거의 없다.

#### 1.2. Runx2와 Cbfb 결여된 생쥐

Runx2 이형접합체 돌연변이는 사람에게 있어서 쇄골 형성부전, 전두골과 두정골 사이 공간확대, 골격 이형성증, 잉여 치아 발생 및 치아돌출 지연 등의 특징을 보이는 cleidocranial dysplasia (CCD)를 유발한다<sup>6,8,9</sup>. Runx2 유전자 기능이 완전히 결여된 생쥐는 연골성 골형성과 막성 골형성의 어느 것도 발생하지 않고 조골세포 분화는 완전히 억제되며 구치(molar) 발생에 있어서 후기 bud 단계로의 진행이 원활하지 못하다<sup>10,11</sup>. Runx2의 카르복시 말단이 잘린 Runx2ΔC 경우에도 *in vitro* 상에서 약 50% 정도의 전사 활성이 있음에도 불구하고 Runx2 결여 생쥐와 같이 골형성이 되지 않는다<sup>2</sup>. 이는 Runx2 카르복시 말단의 150여 아미노산 부위가 Runx2 기능에 필수적임을 시사한다. Cbfb가 결여된 생쥐에서는 태생기 11.5-13.5일경에 일부 조직에서의 출혈과 간혈액생성 결여로 배아가 사망하게 된다. 하지만 여기에 다시 Cbfb를 과발현시켜서 혈액생성 저해를 회복시켜주면 조골세포 분화와 골형성이 지연되기는 하지만 출생 때까지 배아생존이 가능하다<sup>13,14</sup>. 이 결과는 골형성에 있어서 Runx2가 완벽한 기능을 하기 위해서는 Cbfb가 반드시 필요하다는 것을 보여주었다.

Runx2는 비대성 연골세포 분화에도 중요한 역할을 한다.

Runx2 결여 생쥐는 비대성 연골세포 표지자 발현과 말단 비대성 구역의 석회화가 상당히 감소한다<sup>10</sup>. 연골세포 특이적인 프로모터로 연골세포에서 Runx2를 과발현한 형질전환 생쥐는 연골성 골형성이 촉진되고<sup>15</sup>, Runx2 결여된 배아의 연골세포에 Runx2를 과발현시키면 prehypertrophic 및 비대성 연골세포에서 Runx2 발현이 증가하고 배아의 표현형이 부분적으로 회복된다<sup>16</sup>. 이들 배아에서 골형성과 조골세포 분화가 완벽하게 회복되지는 않는 이유는 연골세포에서 Runx2를 과발현 한다고 해서 이들 연골세포를 조골세포로 바꾸지는 못하기 때문이다. 조골세포 특이적인 type I 콜라겐 프로모터로 조골세포에서 Runx2를 과발현한 형질전환 생쥐는 골량이 감소하고 골절이 많다<sup>17</sup>. 이 생쥐에서는 osteocalcin을 발현하는 조골세포와 골세포(osteocyte) 수가 크게 줄어들고 대신에 osteopontin을 발현하는 미성숙된 조골세포가 축적된다. 이는 Runx2 과발현된 조골세포가 세포분화 말기에 불완전한 성숙을 일으켜 미성숙단계의 조골세포로 남아있기 때문이다.

### 2. Osterix

#### 2.1. Osterix (Osx) 구조적 특징 및 발현

Osx는 zinc-finger를 포함하는 조골세포 특이적 전사인자로 C2H2 형태의 3개의 zinc-finger가 있고 전사인자 Sp1, Sp3, Sp4에 있는 DNA 결합 도메인과 높은 상동성을 가진다<sup>18</sup>. 또한 Erythroid Kruppel-like factor (EKLF)와 Sp1의 consensus binding site를 포함하는 몇 개의 기능적인 GC-rich 서열에 강하게 결합하고 아미노 말단 부위에는 강한 전사 활성 도메인을 가지고 있다. 생쥐에서는 태생기 13일 이전에는 나타나지 않고 13.5일경에 분화하는 연골세포에서 처음 발현되어 나중에 막성골이 될 간엽세포 집괴와 연골막 주위에서 높게 발현한다. 태생기 15.5일부터 그 이후로 모든 bone trabeculae와 bone collar 형성에 관련된 세포에서 강하게 발현한다. 출생이후에는 bone trabeculae와 2차 골화중심 부위에서 발현이 강하게 유지되고 골기질과 골내막, 골막등에 존재하는 세포에서 발현이 관찰된다. 치아발생에 있어서는 tooth germ의 치아 간엽세포(mesenchymal cell)와 치아모세포에서 발현되지만 전사조절 기작에 관해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다<sup>19</sup>.

#### 2.2. Osx 결여된 생쥐

Osx 결여된 생쥐의 배아에서 연골 발생은 정상적이지만 골형성은 전혀 관찰되지 않는다<sup>8</sup>. 태생기 16.5일경 연골성 골형성을 보면 연골막과 골막에서부터 dense mesenchyme이 나타나고 혈관과 과골세포가 비대성 연골세포 지역으로 침투한다. 하지만 mesenchyme에 있는 세포들의 분화는 억제된다. 막성 골형성에서도 dense mesenchyme이 발견될 뿐 모든 골형성 부위에서 bone trabeculae는 존재하지 않는다. 또한 대부분의 석회화는 관찰되지 않고 다만 연골성 골형성의 비대성 연골세포 부위에서 석회화가 조금 관찰되고 골막에서는 전혀 발견되지 않는다. Osx가 결여된 돌연변이 배아 골격의 mesenchyme에서는

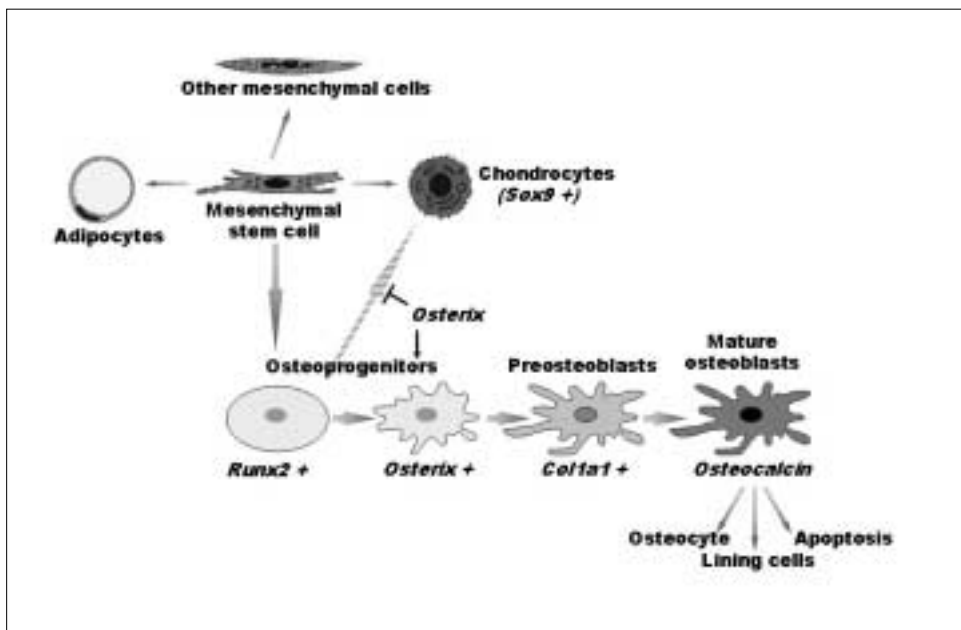
type I 콜라겐 발현이 상당히 감소되어있고 조골세포 표지자인 osteonectin, osteopontin, bone sialoprotein (BSP)이 전혀 관찰되지 않는다. 게다가 태생기 18.5일에서는 말기 조골세포 특이적 표지자인 osteocalcin이 전혀 발현되지 않는다. 그러나, 모든 골격의 dense mesenchyme에서 Runx2가 상당량 발현되는데, Runx2 발현이 정상적임에도 불구하고 Osx가 결여된 배아의 조골세포 분화가 완전히 억제되어있다는 것은 Runx2와 Osx가 같은 경로에서 세포분화를 조절한다는 것을 의미한다. 이는 Runx2가 결여된 생쥐에서도 확인되는데, Runx2 결여된 생쥐 골격에서는 Osx 전사가 전혀 일어나지 않으므로 결론적으로 Osx는 조골세포 분화 경로에서 유전적으로 Runx2 하위라 할 수 있다.

Runx2와 Osx가 각각 결여된 돌연변이 생쥐간의 표현형과 조직병리학적 소견에는 다소 차이가 있다. Osx 결여시에는 많은 간엽조직이 혈관과 함께 연골성 골격의 비대성 연골세포 지역으로 침투하는 것에 반해서, Runx2 결여시에는 단지 가는 연골막과 골막이 존재하고 어떠한 간엽세포도 비대성 연골세포의 기질내로 유입되지 않는다. 또한 Osx 결여 돌연변이에서는 기능을 가진 다핵의 파골세포가 비대성 연골세포의 연골기질와 invading mesenchyme 사이 경계부위에 존재하지만, Runx2 돌연변이에서는 다핵의 파골세포가 전혀 발견되지 않는다<sup>10</sup>. 대신에 Runx2<sup>ΔC</sup> 생쥐에서는 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색시 파골세포가 잘 관찰된다<sup>12</sup>.

### 3. 조골세포 분화 과정

Osx가 결여된 돌연변이의 골형성에서 나타나는 표현형 특성을 바탕으로 조골세포 분화과정을 설정할 수 있다 (Fig. 1). 막성 및 연골성 골형성의 초기과정인 간엽세포 집괴에서 조골세포의 전구세포(progenitors)가 존재하고 이들은 미분화 단계라 전형적인 조골세포 표지 유전자들을 발현하지는 않지만 Runx2와 Cbfb가 필수적 역할을 한다. Osx가 결여된 골세포에서는 조골세포로의 분화가 차단되고 대신에 연골세포의 특성을 보이는 표지 유전자들이 발현된다는 연구결과<sup>10</sup>로 보아 이들 조골세포의 전구세포는 여전히 조골세포나 연골세포, 어디로나 분화할 가능성을 가진다고 할 수 있다. 그러므로 Runx2를 발현하는 전구세포는 하위 유전자인 Osx 발현이 증가하게 되면 조골세포 특이적 표지 유전자들의 발현을 촉진하여 더욱 성숙된 기능을 하는 조골세포로 분화하게 된다.

최근 연구들은 전구세포에서부터 조골세포나 연골세포로 분화해가는 lineage를 분획화하는데 중요한 전사인자들의 역할에 대해 새로운 관점을 제시해 주고 있다. 그 예로써 Sox9은 연골세포 분화 lineage를 결정짓는 전사인자로서 연골세포 분화 경로의 다양한 단계에서 필수적이다. Cre/loxP 시스템을 이용하여 연골성 간엽세포 집괴 전에 Sox9을 비활성화하면 간엽세포 집괴 현상이 일어나지 않고 Runx2 전사가 발생하지 않게



**Fig. 1.** The osteoblast differentiation pathway. Multipotential mesenchymal stem cells can differentiate into many kinds of cell types such as adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts. Mesenchymal stem cells differentiate first into osteoprogenitors in a process that requires Runx2. Progenitor cells that express Runx2 are still bipotential and can differentiate into either osteoblasts or chondrocytes. Sox9, a chondrocyte-specific transcription factor, expresses highly in chondrocytes. Osx is a negative regulator of Sox9 that commits precursor cells that express Runx2 to the osteoblast lineage and prevents them adopting a chondrocyte phenotype. Thus, osteoprogenitor cells differentiate into functional osteoblasts in the presence of Osx that express high concentration of osteoblast-marker genes, including Col1a1 and osteocalcin.

되는데 이는 Sox9이 초기 limb buds에서 Runx2 발현을 위해 필요하다는 것을 의미한다<sup>20</sup>. 하지만 간엽세포 집괴가 완성된 후에 Sox9이 비활성화되면 Runx2 발현과 함께 조골세포 분화가 발생하게 된다<sup>20</sup>. 이러한 결과는 Sox9이 연골세포나 조골세포 어느 쪽으로도 분화가 가능한 osteochondroprogenitor에서 필수적인 인자임을 설명하고 있고, 또다른 최신 연구에서는 생쥐 발생과정 동안에 이런 osteochondroprogenitor 세포가 Sox9 발현하는 전구세포에서부터 유래되었음을 보여주기도 하였다<sup>21</sup>. Osx가 결여된 세포에서는 성숙한 조골세포로의 분화가 억제되고 연골세포 특이적 유전자인 Sox9, Sox5, Col2a1, indian hedgehog (Ihh) 등이 발현되는 전형적인 연골세포의 특성을 보이게 되는데 이는 Osx가 Sox9 발현과 연골세포 표현형의 negative 조절인자임을 의미한다<sup>18</sup>. 그러므로, Osx는 골형성 과정동안 osteochondroprogenitor에서 조골세포나 연골세포로의 분화 lineages를 분획하는 과정에서 결정적인 역할을 한다고 할 수 있다.

#### 4. 치아 및 골형성에 관여하는 다양한 전사인자들

##### 4.1. Msx1과 Msx2

Msx1과 Msx2는 골격 및 치아 발생에 중요한 역할을 하는 homeodomain을 포함하는 전사인자이다<sup>22,23</sup>. 특히 인간의 치아에서 Msx1은 bell 단계의 치아 간엽조직과 안쪽 법랑 상피조직에서 발현한다<sup>22</sup>. Msx1 결여 생쥐에서는 구개열이 관찰되고, 치아 발생뿐만 아니라 상악과 하악골 발생이 결여되어있다<sup>22</sup>. 인간에서 MSX2의 활성 돌연변이는 두개골 봉합(suture) 주위의 골형성이 증가되는 Boston-type craniosynostosis를 유발한다<sup>24</sup>. Msx2 결여 생쥐는 두개골 형태 발생 동안 osteoprogenitor 세포의 불완전한 증식으로 인해 두개골 손상이 유발되고 연골성 골형성에 결함이 있으며 출생 후 뼈에서 Runx2 발현이 감소한다<sup>25</sup>. 또한 Msx1과 Msx2 둘 다 결여된 돌연변이에서는 두개골 및 안면 골격체의 막성 골형성이 절대적으로 부족하다.

##### 4.2. Dlx5와 Dlx6

Dlx5와 Dlx6는 계승상에서 서로 연결되어있고 발생중인 tooth germ과 상악골, 하악골 및 연골에서 발현하며 신경조직에서도 복합된 발현패턴을 보인다<sup>25,26</sup>. Dlx5 결여생쥐는 두개골과 안면에 이상이 발견되고 장골(long bones)에서 골막 두께가 감소한다<sup>27</sup>. Dlx5와 Dlx6 둘 다 결여된 생쥐는 더욱 심각한 골격 이상을 보이는데 특히 아래턱이 위턱 쪽으로 homeotic transformation된 현상을 보이고 인간에서 나타나는 질병인 가운데 손가락이 없어지는 split-hand/split-foot malformation을 보인다<sup>28</sup>. 이 돌연변이 생쥐에서는 조골세포 표지자인 osterocalcin 발현이 지연되긴 하지만 Runx2 발현 패턴은 영향을 없다. Dlx5 과발현 연구에서는 조골세포 분화가 촉진됨을 보여주었다<sup>29</sup>. 그러므로, Dlx5와 Dlx6는 명백한 patterning 역할과 더불어 조골세포 분화와 골형성 촉진에 관여함을 알 수 있다.

#### 4.3. Twist

Basic helix loop helix family에 속하는 전사인자인 Twist는 생쥐의 초기 배아 발생과정 동안에 두개골 봉합 간엽조직에서 발현한다<sup>30</sup>. Twist 결여된 생쥐는 cranial-neural-tube closure에 결함이 있어 태생기 11.5일경에 죽게 되고 두부(head) 간엽조직, 체절(somites), limb buds 등에도 결함이 있다<sup>31</sup>. 인간에서는 TWIST의 반수체 기능부전에 의해 두개골 봉합의 미성숙 융합이 발생하는 Saethre-Chotzen 신드롬이 유발되고<sup>32</sup>, Twist가 결여된 이형접합체 생쥐에서는 인간의 Saethre-Chotzen 신드롬과 유사한 특징이 나타난다<sup>33</sup>. Twist 유전자에 돌연변이가 있는 사람의 calvaria 세포는 성장, alkaline phosphatase 활성, type I 콜라겐 생성 등이 증가하는데 이는 Twist가 조골세포 증식과 분화를 저해하기 때문이다<sup>32,33</sup>.

#### 4.4. Zinc-finger 포함하는 전사인자

Osx처럼 zinc-finger 포함하는 전사인자는 조골세포의 분화 조절에 관여한다. 후뇌 분획화와 말초신경의 수초형성에 관여하는 Krox-20은 생쥐 배아의 비대성 연골세포와 조골세포에서 발현한다. Krox-20 결여생쥐는 장골 길이가 현저히 감소하고 석회화된 trabeculae도 상당히 감소한다<sup>34</sup>. Sp3는 Sp family에 속하는 전사인자로 이 유전자가 결여된 생쥐는 막성 및 연골성 골형성과 후기 치아형성에 큰 결함을 보인다<sup>35</sup>. 이들 생쥐에서는 Runx2는 정상적으로 발현하지만 osteocalcin 발현이 현저하게 감소하므로 Sp3는 후기 골형성의 중요한 전사인자라고 할 수 있다.

### III. 고 찰

치아 및 골형성에 있어서 중요한 전사인자인 Runx2와 Osx 연구는 치아모세포나 조골세포 분화 경로의 새로운 측면을 이해하는데 큰 도움을 준다. 특히 골형성의 측면에서 보면, Runx2와 Cbfb는 조골세포 분화의 초기단계에 필요한 반면 Osx는 pre-osteoblasts가 실질적으로 뼈를 생성하는 기능을 하는 조골세포로 분화하는 후기단계에서 필요하다. Osx가 없는 세포가 연골세포적인 표현형을 보이는 것은 Osx가 연골세포 분화과정의 중요한 인자인 Sox9의 negative 조절인자임을 암시한다. 또한 이것은 Osx가 골형성 동안 bipotential osteochondroprogenitor 세포에서 조골세포와 연골세포로 가는 lineages를 결정하는데 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 골형성 전사인자인 Runx2와 Osx가 조골세포 특이적 하위 표적(target) 유전자를 어떻게 활성화하는지 연구하는 것 또한 아주 중요하다. Runx2와 Osx 유전자 발현과 단백질 활성에 영향을 주는 신호전달 경로를 연구하는 것처럼 이들과 상호작용하는 다른 골형성관련 전사인자의 역할은 앞으로도 더 연구될 필요가 있다.

## 참고문헌

- Olsen BR, Reginato AM, Wang W: Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R: Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995;80:371-378.
- Takeda S, Elefteriou F, Lévassieur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002;111:305-317.
- Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J: Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J Bone Miner Res* 1998;13:155-167.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-754.
- Ryoo HM, Wang XP: Control of tooth morphogenesis by Runx2. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16:143-54.
- Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K: Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel *Drosophila* runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* 1993;194:314-331.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR: Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;89:773-779.
- Kim HJ, Nam SH, Kim HJ, Park HS, Ryoo HM, Kim SY, Cho TJ, Kim SG, Bae SC, Kim IS, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Choi J-Y: Four novel RUNX2 mutations including a splice donor site result in the cleidocranial dysplasia phenotype. *J Cell Physiol* 2006;207:114-122.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-764.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765-771.
- Choi J-Y, Pratap J, Javed A, Zaidi SK, Xing L, Balint V, Dalamangas S, Boyce B, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Jones SN, Stein GS: Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is essential for tissue-specific differentiation during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8650-8655.
- Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T: Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 2002;32:633-638.
- Miller J, Horner A, Stacy T, Lowrey C, Lian JB, Stein G, Nuckolls GH, Speck NA: The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. *Nat Genet* 2002;32:645-649.
- Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T: Skeletal malformations caused by overexpression of *Cbfa1* or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 2001;153:87-100.
- Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G: Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev* 2001;15:467-481.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T: Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001;155:157-166.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B: The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
- Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M, Runx3 negatively regulates *Osterix* expression in dental pulp cells. *Biochem J* 2007;405:69-75.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B: The transcription factor *Sox9* has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox5* and *Sox6*. *Genes Dev* 2002;16:2813-2828.
- Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B: Osteo-chondroprogenitor cells are derived from *Sox9* expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14665-14670.
- Satokata I, Maas R: *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 1994;6:348-356.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R: *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000;24:391-395.
- Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R: The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the *Pro148* → His mutation in the N-terminal arm of the *MSX2* homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 1996;5:1915-1920.
- Zhao GQ, Zhao S, Zhou X, Eberspaecher H, Solursh M, de Crombrughe B: *rDlx*, a novel distal-less-like homeoprotein is expressed in developing cartilages and discrete neuronal tissues. *Dev Biol* 1994;164:37-51.
- Chen X, Li X, Wang W, Lufkin T: *Dlx5* and *Dlx6*: an evolutionary conserved pair of murine homeobox genes expressed in the embryonic skeleton. *Ann N Y Acad Sci* 1996;785:38-47.
- Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S, Bober E, Barbieri O, Simeone A, Levi G: Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the *Distal-less*-related gene *Dlx5*. *Development* 1999;126:3795-3809.
- Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T: The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 2002;16:1089-1101.
- Tadic T, Dodig M, Erceg I, Marijanovic I, Mina M, Kalajzic Z, Velonis D, Kronenberg MS, Kosher RA, Ferrari D, Lichtler AC: Overexpression of *Dlx5* in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res* 2002;17:1008-1014.
- Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, Maxson RE, Thesleff I: Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 2000;127:1845-1855.
- Chen ZF, Behringer RR: *Twist* is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 1995;9:686-699.
- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW: Mutations in *Twist*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997;15:36-41.
- Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F: The variable expressivity and incomplete penetrance of the *twist*-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:945-957.
- Levi G, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Lasagna M, Mantero S, Cancedda R, Charnay P: Defective bone formation in *Krox-20* mutant mice. *Development* 1996;122:113-120.
- Bouwman P, Gollner H, Elsasser HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, Philipsen S, Suske G: Transcription factor *Sp3* is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J* 2000;19:655-661.