

NFI-C 결손 생쥐의 상아모세포 분화과정에서 DSPP와 BSP mRNA의 발현

정현구 · 이창섭 · 이상호 · 이난영 · 김흥중* · 박주철**

조선대학교 치과대학 소아치과학교실, *구강해부학교실, **구강조직학교실, 구강생물학연구소

국문초록

NFI-C는 정상적으로 상아모세포, 골모세포에 존재하며, NFI-C가 결손된 경우 치근상아질을 형성하는 상아모세포의 분화에 이상이 있다고 알려져 있다.

본 연구는 NFI-C (-/-) 생쥐에서 치관 및 치근의 상아질을 형성하는 상아모세포의 표현형을 상아모세포에 특이적으로 발현하는 DSPP와 골모세포에 특이적으로 반응하는 BSP 유전자를 이용한 in-situ hybridization을 통하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NFI-C (-/-) 생쥐의 구치에서 치관 상아질은 정상적으로 형성되었으나, 치근 상아질은 형성되지 않았다.
2. NFI-C (-/-) 생쥐의 하악 절치의 순측 상아질은 비교적 많이 형성되었으나, 설측의 상아질은 형성되지 않았다.
3. NFI-C (-/-) 생쥐의 하악 절치의 상아모세포는 형태가 변화되었으며, 형성된 상아질 내에 세포가 함입되는 양상을 보였다.
4. NFI-C (-/-) 생쥐의 구치에서 치관부위의 상아모세포에서는 DSPP가 강하게 발현되었으나, 치근부위의 상아모세포에서는 발현되지 않았다. 또한 NFI-C (-/-) 생쥐에서 절치의 순측 상아모세포에서는 DSPP가 약하게 발현되었다.
5. 정상 생쥐에서 절치의 상아모세포에서는 BSP가 발현되지 않았으나, NFI-C (-/-) 생쥐에서는 BSP가 강하게 발현되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 NFI-C가 결손된 경우 상아모세포가 골모세포로 분화되는 표현형의 변화를 보이는 것으로 사료된다.

주요어 : NFI-C, 상아모세포 분화, DSPP, BSP

I. 서 론

치아는 많은 부분을 차지하는 상아질, 치관부위의 상아질을 덮는 법랑질, 치근부위의 상아질을 덮고 있는 백악질 등의 무기물질과, 소성결합조직으로 이루어진 치수복합체로 구성되어 있

다. 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑모세포가 분화하여 법랑질을 형성하고, 신경능(neural crest)에서 유래한 외배엽성 간엽세포(ectomesenchymal cell)는 치유두(dental papillae)를 형성하여 상아질과 치수를 형성한다. 또한 치유두 주위의 외배엽성 간엽세포는 치낭(dental sac)을 형성하여 이들이 백악질, 치주인대 그리고 치조골을 형성하는 백악모세포, 섬유모세포, 그리고 골모세포로 분화한다^{1,2)}. 최근에 치아발생에 대한 조직 재조합(tissue recombination)연구에서 상아모세포의 분화는 구강상피의 존재가 필수적이며, 구강상피와 간엽세포사이의 연속적인 상호작용을 통하여 상아질과 법랑질이 분화하는 것으로 알려졌다.

교신저자 : 이 창 섭

광주광역시 동구 서석동 375번지
조선대학교 치과대학 소아치과학교실
Tel : 062-220-3860
E-mail : Csalee@chosun.ac.kr

※ 이 논문은 2002년도 조선대학교 교수해외파견 연구비의 지원을 받아 연구되었음.

치아의 발생 초기에 구강상피의 일부가 비후되어 치배를 형성하며, 이 상피 주위로 신경선에서 유래한 외배엽성 간엽세포가 모여서 축합된다. 발아기(bud stage)에는 치성상피의 분화 유도 영향으로 외배엽성 간엽세포가 상아모세포 전구세포 및 상아모세포로 분화하여 상아질을 형성한다. 모상기(cap stage)와 종상기(bell stage) 또한 외배엽성 간엽세포의 상호유도에 의해 상피세포가 법랑질을 형성할 수 있는 법랑모세포로 분화되어 치관의 법랑질을 형성함으로써 치관이 형성된다. 이러한 치관의 형태발육 과정에서 BMP, FGF, SHH, WNT, 그리고 TNE 등과 같은 다양한 단백질과 Mxs1, -2, Dlx1, -2, 그리고 Pax9 등과 같은 전사인자, 그리고 많은 성장인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다³⁻⁷⁾. 그러나 이러한 다양한 인자들의 치아형성에 대한 복합적인 작용기전의 관계는 정확히 알려져 있지 않다.

치관의 형성이 끝난 직후 내치상피(inner enamel epithelium)과 외치상피(outer enamel epithelium) 두층으로 이루어진 Hertwig 상피근초(Hertwig's epithelial root sheath)가 치근을 따라서 미분화 외배엽성 간엽세포인 치유두세포로부터 상아모세포의 분화를 유도하여 치근 상아질을 형성한다⁸⁾.

현재까지, 치관의 형태 및 법랑질, 상아질이 형성되는 치아 발육의 초기에 관여하는 유전인자는 비교적 많이 알려진 반면, 치아 발육의 후기인 치근 상아질의 형성에 관련된 유전자 및 기전에 대해서는 거의 연구된 바 없다.

유전적인 원인으로 상아질의 형성이상이 오는 경우가 있는데, Saini 등⁹⁾은 영구치의 치근이 형성되지 않은 3증례를 보고 하였으며, Ozer 등¹⁰⁾은 유치나 영구치에서 치근이 형성되지 않거나 짧고 뭉뚱하게 형성된 반면 치관상아질은 정상 혹은 더 많은 상아질의 침착으로 치수가 폐쇄되는 제I형 상아질 무형성증(dentin dysplasia type I)을 보고한 바 있으며, MacDougall 등¹¹⁾은 비정상적인 상아질로 인하여 치아가 쉽게 마모되고 부서지는 상아질 형성부전증 중 치아에 국한된 Witkop II 형과 III형, 그리고 제II형 상아질 무형성증의 원인이 인간 염색체 4q21에 위치한 유전자인 dentin sialophosphoprotein (DSPP), osteopontin(OP), dentin matrix protein 1(DMP1)의 돌연변이일 것이라고 추정하였다. 또한 Xiao 등¹²⁾과 Zhang 등¹³⁾은 I형과 II형의 상아질 형성부전증의 원인이 DSPP의 변이에 의해 발생한다고 보고한 바, DSPP 즉 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein(DPP)이 상아질의 후기 석회화 과정에 관여하는 것으로 간주할 수 있다.

최근에 Steele-Perkins 등¹⁴⁾은 NFI-C (-/-) 생쥐에서 상악 전치의 상아질이 얇게 형성되고, 하악 절치는 부러지기 쉽게 변형되어 비정상적이며 짧은 치근이 형성된다고 하였다. 또한 구치는 치관부는 정상적으로 형성되지만 치근의 발육이 보이지 않는다고 보고하여, NFI-C가 치근상아질을 형성하는 상아모세포의 분화과정에 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 바 있다.

본 연구에서는 NFI-C (-/-) 생쥐에서 치관 및 치근의 상아질을 형성하는 상아모세포의 특성을 상아모세포에 특이적으로 발

현하는 DSPP mRNA와 골조직에 특이적으로 발현하는 bone sialoprotein(BSP) 유전자를 이용한 in-situ hybridization을 통하여 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 조직표본 제작

생후 14일의 정상 생쥐(wild type)와 NFI-C (-/-) 생쥐(knock-out 생쥐)를 Dr. Gronostajski (Department of Biochemistry, School of Medicine, State University of New York at Buffalo)로부터 제공받아, 4% paraformaldehyde (PFA) 용액을 이용하여 관류 고정하였다. 하악과두를 포함한 하악골을 적출하여 4℃, 4% PFA 용액에서 16시간 재고정한 후 DEPC-PBS용액으로 2시간 세척하고, 10% EDTA-1% PFA (pH 7.4) 용액에서 3주간 탈회하고, DEPC-PBS 용액에서 16시간 동안 세척한 후 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV 알코올로 각각 30분씩 탈수하였다. Xylene 용액에서 4회 1시간씩 처리한 후 통법에 따라 파라핀 포매하고 6µm 두께로 전치부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 수직되게 박절한 후 ethoxy silran-coated slide에 붙여 조직표본을 제작하였다.

2. mRNA in-situ hybridization

cRNA probe로 이용할 DSPP와 BSP 유전자 단편들을 제한 효소법으로 절단한 후 pBluescript-SK(+) vector (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA)에 subcloning 한 다음, 염기서열을 분석하여 DNA insert의 방향을 확인하였다. DNA를 선형화하고 Proteinase K로 처리한 후 DIG RNA labelling kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)와 T3 및 T7 RNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 sense와 antisense cRNA probe를 작성하였다.

조직표본 제작과정을 통하여 준비한 절편들을 xylene으로 5분씩 3회 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 함수과정을 거친 후, 고정액(4% formaldehyde in 1X PBS)에 10분간 고정하였다. PBS로 두 차례 세척하고 Proteinase K에 30분 동안 처리 후 0.2N HCl용액으로 20분 동안 처리하였다. Acetylation 용액 (0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리하고 2X SSC(0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate)로 두 차례 세척한 다음 탈수 및 탈지(70% ethanol: 1분, 80% ethanol: 1분, 95% ethanol: 2분, 100% ethanol: 1분, 100% ethanol: 5분, 95% ethanol: 1분) 과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 50% formamide, 10mM Tris-HCl, 200µg/ml tRNA, 600mM NaCl, 0.25%

SDS, 1mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 105 Dextran sulfate가 함유된 hybridization용액에 cRNA 탐침자를 1:300~400배로 희석하여 적용한 후 50℃에서 16시간 동안 hybridization을 시행하였다.

Hybridization 후 2X SSC, 0.2X SSC 및 0.2X SSC-50% formamide로 각각 세척한 다음 1.5% blocking reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)가 함유된 Dig buffer I(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl)으로 다시 세척하고 1% blocking reagent로 30분간 처리한 후 anti-Dig antibody를 1:500으로 Dig buffer I에 희석하여 4℃에서 30분간 처리하였다. 다시 Dig buffer II(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 500mM MgCl₂)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt and

5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/ BCIP)로 발색하고 Dig buffer III(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA)로 5분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 정상 생쥐와 NFI-C (-/-) 생쥐의 분화중인 상아모세포에서 DSPP의 발현

구치의 종단 표본에서 정상 생쥐의 치근 상아질은 정상적인 형성을 보였으나, NFI-C (-/-) 생쥐에서는 아주 짧은 치근상아질의 형성을 관찰할 수 있었다.

정상 생쥐의 치관과 치근 상아질을 형성하는 상아모세포는 정상적으로 키가 크고 극성을 띠고 있었으며, 형성된 상아질에 수직으로 잘 배열된 양상을 보였으며 DSPP에 강하게 발현되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1A). 반면 NFI-C (-/-) 생쥐의 구치 종단 표본에서 치관의 상아질을 형성하는 상아모세포는 정상적인 상아모세포의 형태를 보이며, 정상적인 상아질이 형성되어 DSPP도 잘 발현되었다. 그러나 치근부위의 상아모세포에서는 DSPP가 발현되지 않았다(Fig. 1B).

정상 생쥐와 NFI-C (-/-) 생쥐 모두 구치부 종단 표본에서 미분화한 외배엽성 간엽세포와 키가 작고 비교적 많은 수의 세포로 이루어진 상아모세포 전구세포 (preodontoblast)들은

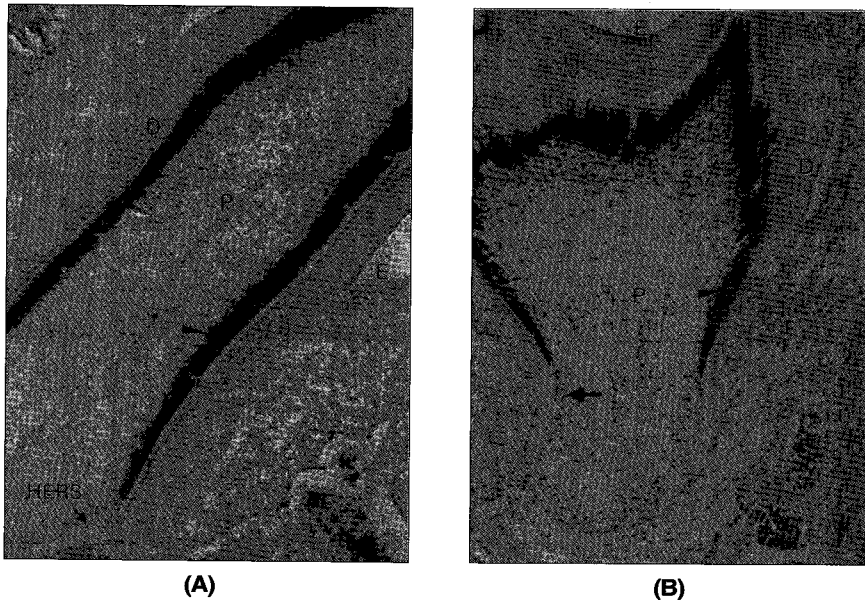


Fig. 1. Expression of DSPP mRNA on the odontoblast in the longitudinal section of mandibular molars from wild type (1A) and knock-out (1B) mice. A: A normal molar shows normal shapes of the differentiation of odontoblast and the formation of root dentin (arrow head). The strong expression of DSPP mRNA shows in the odontoblast forming crown and root dentin. B: The odontoblast forming crown dentin shows normal shapes of odontoblast and strong expression of DSPP (arrow head), but the odontoblast forming root dentin, especially apical, disappear the secretory activity of odontoblast (arrow). (E: Enamel, D: Dentin, P: Pulp, HERS: Hertwig's Epithelial Root Sheath)

DSPP에 발현되지 않았다(Fig. 1A).

정상 생쥐의 절치 횡단 표본에서는 타원형으로 잘 형성된 상아질과 상아질 내면에 규칙적으로 잘 배열된 상아모세포는 DSPP에 강하게 발현되었다(Fig. 2A). 그러나, NFI-C (-/-) 생쥐의 절치 횡단 표본에서는 설측의 상아질이 형성되지 않아

치수가 노출되어 있었으며, 치아의 법랑기쪽의 순면에는 상아질이 일부 형성되어 있으나 골세포와 형태가 유사한 다수의 둥근 세포들이 기질에 함입되어 있었으며, 함입된 세포에서는 DSPP가 약하게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 비정상적인 상아질을 형성하는 상아모세포는 세포의 극성을 상실하고

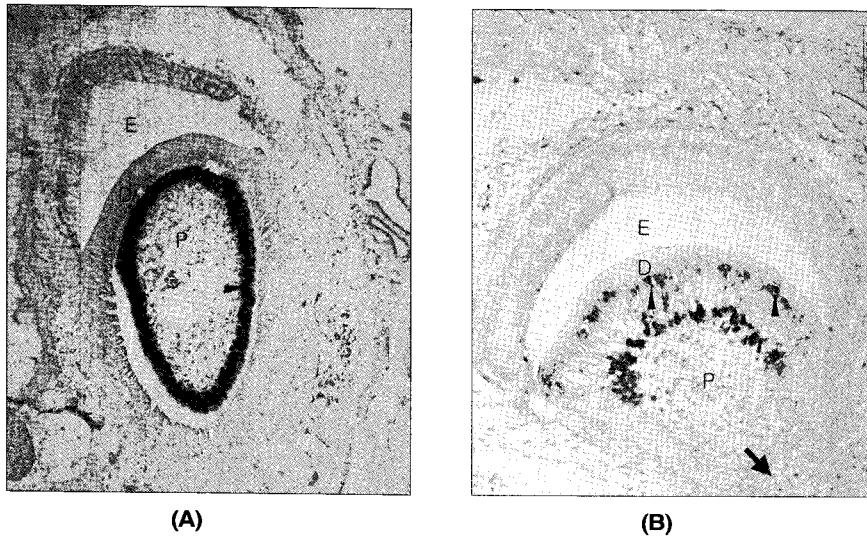


Fig. 2. Expression of DSPP mRNA on the odontoblast in the cross section of mandibular incisors from wild type (1A) and knock-out (1B) mice. A: a normal incisor shows well formed circular dentin, normal shapes of odontoblast and strong expression of DSPP in the odontoblast that line the inner surface of the dentin (arrow head). B: Incisors of mutant shows open area on the lingual part of incisor as a result of failure of dentin formation (arrow). The abnormal oval shape of odontoblast, and loss of polarities, irregularly arranged odontoblast, which show weak expression of DSPP, and the thick osteodentin that contains numerous trapped cells, empty spaces are observed (arrow head). (E: Enamel, D: Dentin, P: Pulp)

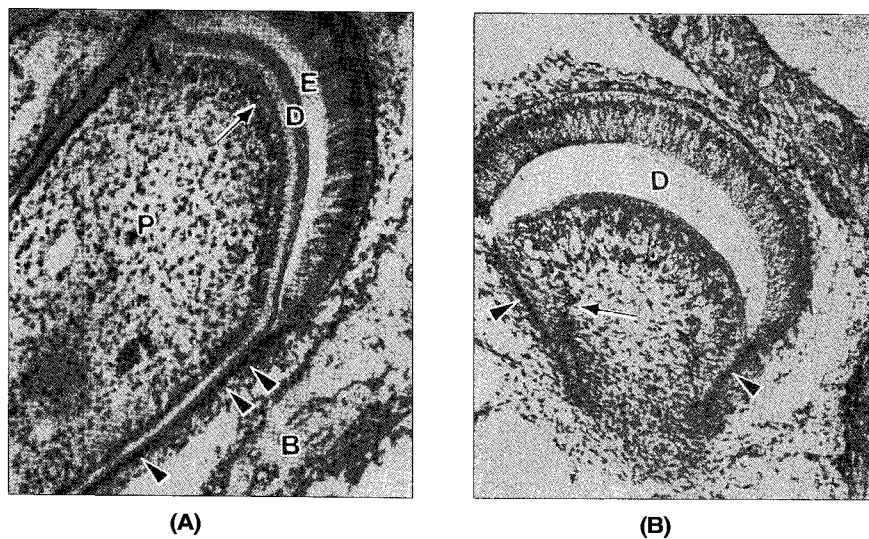


Fig. 3. Expression of BSP mRNA on the odontoblast in the cross section of mandibular incisors from wild type (3A) and knock-out (3B) mice. A: a normal incisor shows no expression of BSP in the odontoblast (arrow), but strong expression of BSP in cementoblast (arrow head) and osteoblast. B: The incisor of mutant type shows strong expression of BSP in odontoblast (arrow), cementoblast (arrow head), and osteoblast. (B: Bone, E: Enamel, D: Dentin, P: Pulp)

등근 형태를 보이며 불규칙하게 흩어져 있는 양상을 보였으며, DSPP에도 비교적 약하게 발현된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2B).

NFI-C (-/-) 생쥐의 구치 종단 표본에서 법랑질이 존재하지 않는 근단부에는 치근상아질이 형성되지 않은 반면, 절치 횡단 표본에서는 법랑질과 접하는 순측 부위에 비정상적으로 형성된 상아질과 상아모세포가 DSPP에 약하게 발현되는 양상을 관찰할 수 있었다.

2. 정상 생쥐와 NFI-C (-/-) 생쥐에서 분화중인 상아모세포의 BSP의 발현

정상 생쥐의 절치 횡단 표본에서는 잘 형성된 상아질과 상아질 내면에 규칙적으로 잘 배열된 상아모세포에서 BSP가 발현되지 않았으며, 형성된 상아질을 덮는 백악모세포(cementoblast)와 골표면을 따라 존재하는 골모세포(osteoblast)는 BSP에 강한 발현을 보였다(Fig. 3A). 반면 NFI-C (-/-) 생쥐의 절치 횡단표본에서는 백악모세포, 골모세포는 물론 비정상적인 형태를 보이는 상아모세포에서도 BSP가 강하게 발현되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 3B).

IV. 총괄 및 고안

Nuclear factor I(NFI) family는 전사-복제 인자들로 닭, 생쥐, 햄스터, 돼지 및 사람에서는 NFI-A, NFI-B, NFI-C 그리고 NFI-X의 네 가지 유전자들로 이루어져 있으며, 시험관에서 adenovirus의 DNA 복제에 필요한 단백질로 처음 발견되었다. NFI-A 유전자가 없으면 뇌의 발생에 이상이 생기며¹⁵⁾, NFI-B가 상실되면 뇌와 폐의 발생 이상이 초래된다¹⁶⁾. 최근에 Steele-Perkins 등¹⁴⁾에 의하면 NFI-C를 결손시킨 경우 구치의 치근이 형성되지 않은 것으로 보아 NFI-C는 치근 상아질을 형성하는 상아모세포의 분화과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

치질의 많은 부분을 구성하는 상아질을 형성하는 상아모세포는 형태적으로, 그리고 기능적으로 몇 가지의 특징을 갖는다⁹⁾. 전구상아모세포(preodontoblast)는 세포주기(cell cycle)가 중단되는데, 마지막 분열과정 중에 mitotic spindle은 상피간엽결합부(epithelio-mesenchymal junction)인 기저막(basement membrane)에 수직으로 배열된다. 기저막과 접촉된 상아모세포 전구세포는 길어져서 실린더 형태를 보이며 극성을 갖는다. 핵이 치수 측에 위치하고, 골지체(Golgi apparatus)는 핵 중앙에 위치하게 되며, 조면내면형질세망(rER)이 세포의 중앙에서 발달하여 세포의 장축에 평행하게 배열되며 원심측의 세포질 대부분을 차지하게 된다. 상아모세포 전구세포가 상아모세포로 분화하여 첫 층의 상아질(mentle dentine)을 형성한 후 키가 더욱 커지며(50~60 μ m), 원심측의 부착결합(adherent junction)과 봉쇄효과와 관련이 있는 것으로 알려진 치밀결합(tight junction)이 더욱 발달하여 상아질의 내면을 따라 한 층으로 배

열됨으로써 상피와 비슷한 세포(epitheloid cell)층을 형성한다^{2,17)}. 분화된 상아모세포는 제I형, 제III형, 제V형 및 제VI형 교원질, 그리고 decorine과 bi-glycan과 같은 proteoglycan, osteocalcin, osteopontin, osteonectin과 같은 당단백질을 합성한다. 그리고 상아질과 상아모세포에 특이성을 가지고 있는 DSPP를 특이적으로 합성하여 분비한다^{2,18)}.

상아질 기질이 침착하게 됨에 따라 상아모세포는 치수의 중앙을 향해 이동하며, 세포질 돌기들이 원심측에 형성중인 상아질 기질에 남겨짐으로써 상아세관이 형성된다. 치관과 치근의 상아질 형성이 완료된 후 상아모세포의 분비활동은 현저히 떨어지며 외상이 없는 한 치아와 같이 생존한다. 그러나 국소적인 큰 외상으로 인하여 1차 상아모세포가 실패되면 치수내의 전구세포가 상아모세포양세포(odontoblast-like cell)로 분화하여 수복상아질(reparative 혹은 tertiary dentin)을 형성한다¹⁹⁾.

본 연구에서 NFI-C (-/-) 생쥐의 구치 치관부에서는 상아질이 정상적으로 균일한 양상으로 형성되었으나, 치근부에서는 상아질이 거의 형성되지 않았다(Fig. 1B). 이는 NFI-C가 후기 치아의 발생 과정, 특히 치근 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 하악 절치의 횡단 표본에서 설측의 상아질이 형성되지 않을 뿐만 아니라, 법랑질과 인접한 상아질에 많은 공간이 있으며, 불규칙한 양상을 보였다(Fig. 2B). 이는 Beertsen 등²⁰⁾이 쥐의 하악 절치의 치관 상아질과 치근 상아질을 형성하는 상아모세포의 기능이 다소 다르다고 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 구치의 치관 상아질과 하악 절치의 상아질 형성기전이 다를 수도 있을 것으로 추측할 수 있다.

또한 Beertsen 등²⁰⁾은 교원질을 파괴하는 효소인 membrane-type matrixmetalloproteinase-1(MT1-MMP)을 결손시킨 생쥐에서 치아의 맹출은 물론 구치 치근의 길이가 정상 치아의 1/3정도로 짧아진다고 보고하여 MT1-MMP가 구치 치근의 성장과 치아의 맹출에 중요한 역할을 함을 시사하였다. 따라서 본 연구에서의 NFI-C (-/-) 생쥐의 치근 미발육 상황에서 MT1-MMP의 역할에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 사료된다.

세포가 극성을 띠면 세포가 길어지고, 세포소기관(organelles)들의 분포도 변화하고 terminal web도 출현하며, 그리고 특징적인 세포돌기들이 형성된다. 또한 미소관(microtubule), 중간세사(intermediate filament), 미세사(microfilament) 등의 재배열도 필요하다. 치밀결합(tight junction), 부착결합(zonular adherens), 그리고 간극결합(gap junction)의 형성이 증가하며, 이러한 결합장치들은 세포-기질 상호작용과 극성을 띤 상아모세포의 기능적 활동을 조절한다^{17,19)}. 이 과정에는 fibronectin, Decorin, TGF β s, IGFs, FGFs 등이 관여하는 것으로 추정하고 있다^{19,21)}. 본 연구에서 NFI-C (-/-) 생쥐의 상아모세포는 정상 상아모세포의 형태와 다르게 세포의 키가 작고 타원형 모양이었으며, 세포 극성과 방향성이 상실되고 매우 불규칙하게 배열된 양상을 보였다(Fig. 2B). 이는 이러한 결합장치들의 형성과정에 NFI-C가 직접 혹은 간접적으로

관여하는 것으로 추정할 수 있다. 또한 이러한 결합장치의 형성 장애로 인하여 비정상적인 상아모세포들은 골형성 과정의 골모세포와 유사하게 형성된 상아질에 합입되어 있었다. 이는 성숙된 치아에서 수산화칼슘에 의해 형성되는 초기의 수복상아질에 세포가 합입되는 양상을 보이는 소견²²⁾과 일치한다.

DSPP는 비교원질성 단백질로써 대표적인 상아질-특이 단백질로, 하나의 유전자로부터 DSP와 DPP의 두 가지 단백질을 합성하며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,23)}. 반면에 BSP는 골의 석회화 과정에 관여하는 인자로 알려져 있어²⁴⁾, BSP와 DSPP가 골과 상아질을 구분하는 실험에 많이 이용된다.

Ye 등²⁵⁾은 dentin matrix protein-1 (DMP-1) 결손 생쥐에서 치아의 모양과 크기는 정상이지만 미성숙 상아질이 상아질로 성숙하지 않아 큰 치수강, 넓은 predental zone, 두께가 감소된 상아질, 그리고 저석회화된 치아를 보고하였는데, 이는 상아질 형성부전증과 유사한 소견이며, 그들은 또한 DMP-1이 결손된 생쥐에서 DSPP의 발현도 현저히 감소되었다고 보고하였다. 이는 Sreenath 등²⁶⁾이 보고한 DSPP 유전자를 차단한 생쥐에서 발생한 치아의 소견과 유사하며, 이 결과는 DMP-1이 DSPP 유전자를 조절할 가능성이 있음을 시사한다. 또한 Steele-Perkins 등¹⁴⁾에 의하면 NFI-C 유전자는 치아 발생과정에서 외배엽성 간엽세포에서는 발현되지 않고 상아모세포 전구세포에서 발현되기 시작하여 상아모세포의 분화가 진행되어 감에 따라 발현이 증가한다고 하였다. 본 연구에서 NFI-C 결손 생쥐의 구치 치근 부위와 절치에서 상아모세포는 DSPP에 발현되지 않거나 약한 발현을 보였는데, 이는 Steele-Perkins 등¹⁴⁾이 주장하는 것과 같이 NFI-C의 기능을 상실함으로써 상아모세포가 분화되는 말기에 정상적인 분화가 되지 못하여 DSPP의 합성과 분비가 이루어지지 않았다는 것을 시사하며, 상아모세포로서의 특성을 잃은 것으로 사료된다.

본 연구에서 정상 생쥐의 하악 절치 상아모세포는 BSP가 전혀 발현되지 않았으나, NFI-C (-/-) 생쥐의 절치 표본에서는 백악모세포, 골모세포에서와 유사하게 강한 발현을 보였다. 이는 NFI-C (-/-) 생쥐의 상아모세포는 골을 형성하는 골모세포의 특징을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구를 종합하여 보면 NFI-C는 상아모세포의 분화에 중요한 역할을 하며, NFI-C가 결손되면 상아모세포는 본래의 특성을 상실하고 골모세포로 표현형이 변화하는 것으로 추측되나, 분화과정의 기전과 더불어 NFI-C의 역할을 구명하기 위해서는 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

NFI-C는 정상적으로 상아모세포, 골모세포에 존재하며, NFI-C가 결손된 경우 치근상아질을 형성하는 상아모세포의 분화에 이상이 있다고 알려져 있다.

본 연구는 NFI-C (-/-) 생쥐에서 치관 및 치근의 상아질을

형성하는 상아모세포의 표현형을 상아모세포에 특이적으로 발현하는 DSPP와 골모세포에 특이적으로 반응하는 BSP 유전자를 이용한 in-situ hybridization을 통하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NFI-C (-/-) 생쥐의 구치에서 치관 상아질은 정상적으로 형성되었으나, 치근 상아질은 형성되지 않았다.
2. NFI-C (-/-) 생쥐의 하악 절치의 순측 상아질은 비교적 많이 형성되었으나, 설측의 상아질은 형성되지 않았다.
3. NFI-C (-/-) 생쥐의 하악 절치의 상아모세포는 형태가 변화되었으며, 형성된 상아질 내에 세포가 합입되는 양상을 보였다.
4. NFI-C (-/-) 생쥐의 구치에서 치관 부위의 상아모세포에서는 DSPP가 강하게 발현되었으나, 치근 부위의 상아모세포에서는 발현되지 않았다. 또한 NFI-C (-/-) 생쥐에서 하악 절치의 순측 상아모세포에서는 DSPP가 약하게 발현되었다.
5. 정상 생쥐에서 절치의 상아모세포에서는 BSP가 발현되지 않았으나, NFI-C (-/-) 생쥐에서는 BSP가 강하게 발현되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 NFI-C가 결손된 경우 상아모세포가 골모세포로 분화되는 표현형의 변화를 보이는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Maas R, Bei M : The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8:4-39, 1997.
2. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C : Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39:51-68, 1995.
3. Jernvall J, Thesleff I : Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 92:19-29, 2000.
4. Peters H, Balling R : Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet*, 15:59-65, 1999.
5. Ruch JV : Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol*, 76:923-938, 1998.
6. Thesleff I : Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int*, 34:613-620, 2003.
7. Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, et al. : Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec*, 245:151-161, 1996.
8. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, et al. : Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 123:527-533, 2003.
9. Saini TS, Kimmes NS, Westerman GH : Aberrant root formation: review of root genesis and three case

- reports. *Pediatr Dent*, 26:261-265, 2004.
10. Ozer L, Karasu H, Aras K, et al. : Dentin dysplasia type I: report of atypical cases in the permanent and mixed dentitions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98:85-90, 2004.
 11. MacDougall M, Simmons D, Gu TT, et al. : MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect Tissue Res*, 43:320-330, 2002.
 12. Xiao S, Yu C, Chou X, et al. : Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet*, 27:201-204, 2001.
 13. Zhang X, Zhao J, Li C, et al. : DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Gene*, 27:151-152, 2001.
 14. Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, et al. : Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol*, 23:1075-1084, 2003.
 15. Ling G, Hauer CR, Gronostajski RM, et al. : Transcriptional regulation of rat CYP2A3 by nuclear factor I: identification of a novel NFI-A isoform, and evidence for tissue-selective interaction of NFI with the CYP2A3 promoter in vivo. *J Biol Chem*, 279:27888-27895, 2004.
 16. Shu T, Butz KG, Plachez C, et al. : Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci*, 23:203-212, 2003.
 17. Arana-Chavez VE, Massa LF : Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:1367-1373, 2004.
 18. Feng JQ, Luan X, Wallace J, et al. : Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*, 273:9457-9464, 1998.
 19. Smith AJ, Lesot H : Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 12:425-437, 2001.
 20. Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, et al. : Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. *Connect Tissue Res*, 44:298-299, 2003.
 21. Lesot H, Lisi S, Peterkova R, et al. : Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 15:8-13, 2001.
 22. Goldberg M, Six N, Decup F, et al. : Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res*, 15:91-95, 2001.
 23. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, et al. : Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol*, 38:571-576, 1993.
 24. Chien HH, Lin WL, Cho MI : Expression of TGF-beta isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res*, 34:301-309, 1999.
 25. Ye L, MacDougall M, Zhang S, et al. : Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem*, 279:19141-19148, 2004.
 26. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, et al. : Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem*, 278:24874-24880, 2003.

Abstract

EXPRESSION OF DSPP AND BSP MRNAS DURING ODONTOBLAST
DIFFERENTIATION IN THE NFI-C (-/-) MICE

Hyun-Ku Jung, Chang-Seop Lee, Sang-Ho Lee, Nan-Young Lee,
Heung-Joong Kim*, Joo-Cheol Park**

*Department of Pediatric Dentistry, *Oral Anatomy, **Oral Histology,
and Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University*

Nuclear factor I (NFI) exists in the odontoblast and osteoblast. NFI-C null mice demonstrated aberrant odontoblast differentiation, abnormal dentin formation, and molar lacking roots.

The purpose of this study was to examine phenotype of the aberrant odontoblast in NFI-C null mice and to evaluate the expression of DSPP and BSP mRNAs in NFI-C null mice with in-situ hybridization.

The results were as follows:

1. In the NFI-C (-/-) mice, the crown dentin of molar showed normally formation, but there was no root dentin.
2. In the NFI-C (-/-) mice, the labial dentin of mandibular incisors showed relatively a lot of dentin formation, but the lingual dentin showed defect.
3. In the NFI-C (-/-) mice, the odontoblast of mandibular incisors revealed abnormal shape and trapped in osteodentin-like mineralized tissue.
4. In the NFI-C (-/-) mice, the odontoblast in the crown dentin of molars showed strong expression of DSPP, the odontoblast in the root dentin of molars was not expression of DSPP. In the NFI-C (-/-) mice the odontoblast in the mandibular incisors showed weakly expression of DSPP.
5. In the wild mice, the odontoblasts of mandibular incisors were not expression of BSP, but in the NFI-C (-/-) mice the odontoblast of mandibular incisors showed strong expression of BSP.

These results suggest that odontoblast in the NFI-C (-/-) mice changes the phenotype into osteoblast.

Key words : NFI-C, Odontoblast differentiation, DSPP, BSP