

법랑모세포 분화와 성숙과정에서 OD314의 발현

박주철¹ · 안성민¹ · 김흥중¹ · 정문진¹ · 박민주¹ · 신인철¹ · 손호현^{2*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실 및 BK21, ²서울대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

EXPRESSION OF OD314 DURING AMELOBLAST DIFFERENTIATION AND MATURATION

Joo-Cheol Park¹, Seong-Min Ahn¹, Heung-Joong Kim¹, Moon-Jin Jeong¹,
Min-Ju Park¹, In-Cheol Shin¹, Ho-Hyun Son^{2*}

¹Department of Oral Histology and BK21, School of Dentistry, Chosun University,

²Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University

Ameloblasts are responsible for the formation and maintenance of enamel which is an epithelially derived protective covering for teeth. Ameloblast differentiation is controlled by sequential epithelial-mesenchymal interactions. However, little is known about the differentiation and maturation mechanisms. OD314 was firstly identified from odontoblasts by subtraction between odontoblast/pulp cells and osteoblast/dental papilla cells, even though OD314 protein was also expressed in ameloblast during tooth formation.

In this study, to better understand the biological function of OD314 during amelogenesis, we examined expression of the OD314 mRNA and protein in various stages of ameloblast differentiation using *in-situ* hybridization and immunohistochemistry.

The results were as follows :

1. The ameloblast showed 4 main morphological and functional stages referred to as the presecretory, secretory, smooth-ended, and ruffle-ended.
2. OD314 mRNA was expressed in secretory ameloblast and increased according to the maturation of the cells.
3. OD314 protein was not expressed in presecretory ameloblast but expressed in secretory ameloblast and maturative ameloblast. OD314 protein was distributed in entire cytoplasm of secretory ameloblast. However, OD314 was localized at the proximal and distal portion of the cytoplasm of smooth-ended and ruffle-ended ameloblast.

These results suggest that OD314 may play important roles in the ameloblast differentiation and maturation. [J Kor Acad Cons Dent 30(5):423-431, 2005]

Key words: Ameloblast, OD314, Differentiation, Maturation, Smooth-ended, Ruffle-ended

- Received 2005.5.13., revised 2005.7.28., accepted 2005.8.23. -

* Corresponding author: Ho-Hyun Son

Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Seoul National University
28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, Korea 110-749
Tel: 82-2-2072-2652 Fax: 82-2-2072-3859
E-mail: hhson@snu.ac.kr

I. 서 론

법랑모세포는 치아의 법랑질을 형성하는 세포로 외배엽에서 기원한다. 법랑모세포는 법랑질의 유기기질을 분비하고 독특한 양상의 법랑질 석회화 과정에도 관여한다. 법랑질

※ 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10141-0)지원으로 수행되었음.

형성과정의 법랑모세포는 형태와 기능적으로 분비 전단계 (presecretory stage)와 분비기 (secretory stage) 그리고 성숙기 (maturation stage)의 분화-성숙의 주요 3단계로 구분할 수 있다¹⁾.

법랑모세포는 법랑질을 형성할 때 유기기질과 무기질을 동시에 분비하여 부분 광화된 상태로 존재하다가 성숙해감에 따라 높은 함량의 유기기질을 제거하고 석회화 기질 성분을 높여가는 형태로 법랑질을 석회화시키기 때문에, 유기기질이 먼저 분비되고 나중에 석회화가 진행되는 때, 상아질 그리고 백악질의 석회화 과정과는 다르다²⁾. 또한 법랑모세포는 법랑질 형성 후에 치은의 접합상피 (junctional epithelium)로 잔존하는 극히 일부를 제외하고는 치아에 존재하지 않기 때문에 골모세포, 상아모세포 그리고 백악모세포가 치아에 존재해서 경우에 따라 골, 상아질, 백악질의 유지와 치유 및 재생에 관여하는 양상과도 다르다. 최근에 활발한 분자생물학적 연구를 포함하여 법랑모세포에 관한 많은 연구에도 불구하고³⁻⁶⁾, 법랑모세포가 법랑질 완성 후에 존재하지 않는 세포 접근의 한계와 법랑모세포가 갖는 세포의 단계에 따른 다양한 변화와 석회화의 독특한 특성으로 인하여, 현재까지 법랑모세포의 분화와 성숙 그리고 법랑질의 석회화에 관련된 인자와 기전에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

최근에 Dey 등⁷⁾이 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관여하는 기전을 밝힐 목적으로 두개골의 골모세포 (calvarial osteoblast)와 치유두 세포 (dental papilla cell)에서는 발현되지 않고 상아모세포/치수세포 (odontoblast/pulpal cell)에서 특이하게 발현되는 상아모세포-특이 인자 OD314를 보고하였다. 또한, northern 분석에서 OD314 mRNA가 뼈, 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 골격근에서는 발현되지 않으며 상아모세포에서 선택적으로 발현된다고 하여, OD314의 상아모세포 분화과정과 상아질 형성과정에서의 역할을 암시하였다. 또한, Kim 등^{8,9)}은 OD314가 154아미노산을 합성하는 그 기능이 알려져 있지 않는 새로운 유전자로 주로 세포질에 존재하며, mRNA와 그 합성 단백질이 상아모세포에서 선택적으로 발현되며, 사람 치수세포의 분화과정에서 OD314가 치수세포가 상아모세포로 분화하는 초기 과정에 발현되어 그 발현이 유지되다가 석회화 과정에서 더욱 증가한다고 하여 OD314가 상아질의 석회화 과정에 관여함을 시사하였다. 그러나, 최근에 김¹⁰⁾은 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314의 법랑모세포에서의 역할을 암시하였다.

이에 본 연구에서는 생쥐 하악 전치의 다양한 시기의 법랑모세포를 이용하여, 형태학적 분석과 *in-situ* hybridization에 의한 OD314 mRNA의 발현 그리고 OD314 항체

를 이용한 면역조직화학적 분석을 통하여 최근에 새롭게 알려진 OD314 유전자의 법랑모세포의 분화와 성숙과정에서의 역할을 규명하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 조직 표본제작과 hematoxylin-eosin 염색

생후 7일, 21일, 40일의 생쥐를 각각 5마리씩 4% paraformaldehyde (PFA) 용액을 이용하여 관류 고정시킨 후 하악 전치를 포함한 하악골을 적출한 다음 4℃, 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 후 고정하였다. 고정 후 Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) 용액으로 2시간 세척하고, 10% EDTA (pH 7.4) 용액에서 2주에서 4주간 탈회하고, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II, 100% III, 100% IV ethanol로 각각 12시간씩 탈수하였다. Chloroform 용액에서 4회 2시간씩 처리한 후 통법에 따라 paraffin 포매하고 5 μ m 두께로 전치부에서부터 순차적으로 치아의 장축에 직각되게 박절한 후, 일부는 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 형태학적으로 관찰하고, 나머지는 4℃ 상태에서 보관하여 mRNA *in-situ* hybridization과 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

2. *In-situ* hybridization

1197 bp의 OD314 cDNA를 제한 효소 절단한 후 pBluescript-SK(+) vector (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA)에 subcloning한 다음, 다시 한번 sequencing하여 DNA insert의 방향을 확인하였다. DNA를 선형화하고 Proteinase K 처리 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.

절편들을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 수화한 후, 4% PFA에 10분간 고정하였다. PBS로 두 차례 세척하고 acetylation 용액 (0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 2 \times 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, 10 mM Tris-HCl, 200 μ g/ml tRNA, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, 1

mM EDTA, $1 \times$ Denhardt's solution, 10% Dextran sulfate가 함유된 용액에 OD314 cRNA 프로브를 50℃에서 16시간 hybridization 하였다. Hybridization 후 $2 \times$ SSC, $0.2 \times$ SSC I, $0.2 \times$ SSC II로 각각 세척한 다음 1.5% Blocking Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)가 함유된 Dig buffer I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)으로 다시 세척하고 anti-Dig antibody를 1:88으로 Dig buffer I에 희석하여 4℃에서 30분간 처리하였다. 다시 Dig buffer II (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM MgCl₂)로 세척하고 nitroblue tetrazolium salt and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/ BCIP)로 발색하고 Dig buffer IV (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)로 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 항체의 제작 및 면역조직화학적염색

1) 항체의 제작

김 등⁸⁾에 의하여 OD314 단백질 영역에서 주문 제작된 항체 CST15와 CPE14를 실험에 이용하였다.

2) 면역조직화학적 염색

In-situ hybridization때 사용된 것과 동일한 절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 흡수 후, 0.1M PBS로 두 차례 세척하고, 0.3% 과산화수소가 포함된 완충액 (Methanol 40 ml + 30% H₂O₂ 0.4 ml)에서 20 - 30분 동안 endogenous peroxidase block 처리한 후 다시 PBS로 세 차례 세척하였다. 이 절편을 0.5% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 PBS 용액을 사용하여 희석된 normal serum으로 20분 동안 예비 항온 처리한 뒤, PBS로 세척하였다. 절편을 normal serum을 사용하여 1:100의 비율로 희석한 OD314 항혈청 (1차 항체)으로 4℃에서 하룻밤 동안 항온 처리하였다. PBS로 40분 동안 세척한 후, 절편을 2차 항체로서 0.5% BSA로 희석 (1drop/0.5% BSA sol 10 ml)한 염소 항토끼 IgG항체 (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)와 실온에서 1시간 동안 항온 처리하였다. PBS로 20분 동안 세척한 후, 단편을 사용하기 30분전에 PBS로 희석한 ABC 시약 (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)과 45분 동안 반응시켰다. PBS로 20분 동안 세척한 후 0.05% DAB (Deaminobenzidine Tetrahydrochloride)를 이용한 비색반응으로 발색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 실험결과

1. Hematoxylin-eosin 염색 소견

하악 전치의 종단표본에서 전체적으로 외치상피 (external dental epithelium)와 성상세망세포 (stellate reticulum) 그리고 중간층 (stratum intermedium)의 세포가 법랑모세포 위에 3-4 세포 층 두께로 배열되어 있었으며, 하부에서 법랑질의 형성이 진행되고 있었다.

1) 분비 전단계 법랑모세포 (presecretory ameloblasts) 법랑모세포는 키가 큰 원주형태로 세포질이 풍부하였으나, 입방형의 세포의 핵들이 근심층에 배열하고 세포질의 호염기성 염색성이 증가하는 것과 같은 뚜렷한 세포 극성 소견은 관찰되지 않았다 (Figure 1A).

2) 분비기 법랑모세포 (secretory ameloblasts) 법랑모세포는 키가 큰 원주 형태로 세포질이 풍부하였고, 세포의 핵이 근심 층에 배열하고 세포질의 핵 근처는 일부 밝게 보이면서 중앙 부위는 호염기성 염색성이 증가하는 전형적인 세포 극성을 띄면서 단백질을 분비하는 세포의 소견을 보였다. 세포질의 원심부에는 톱니 모양인 Tomes 돌기들이 일부 관찰되었다 (Figure 1B).

3) 성숙기 (maturation stage): 평탄끝법랑모세포 (smooth-ended ameloblast) 분비기 세포에 비하여 법랑모세포의 형태가 입방형으로 바뀌고 세포의 핵은 근심부에 치우쳐 존재하였다. 세포의 전체적인 크기가 감소하면서 세포질의 양도 감소된 양상이었으나, 법랑모세포와 형성된 법랑질 사이에는 간격 없이 평탄한 모양을 보였다 (Figure 1C).

4) 성숙기 (maturation stage): 주름끝법랑모세포 (ruffle-ended ameloblast) 법랑모세포의 형태는 분비기 세포에 비하여 입방형으로 형태를 띄며 세포의 핵은 근심부에 치우쳐 존재하였으나, 세포질의 양이 감소되었다. 법랑모세포와 형성된 법랑질 사이에는 약간의 공간이 나타나면서 불규칙한 형태를 보였다 (Figure 1D).

2. OD314 mRNA와 단백질의 발현

설치류의 치아 특성에 맞게 중단된 하악 전치는 치근 쪽에서부터 법랑모세포의 분화 단계를 3단계로 구분할 수 있었다 (Figure 2A). 치근 쪽 (영역 I)은 법랑모세포의 분화과정에서 내치상피 (internal dental epithelium)와 분비전

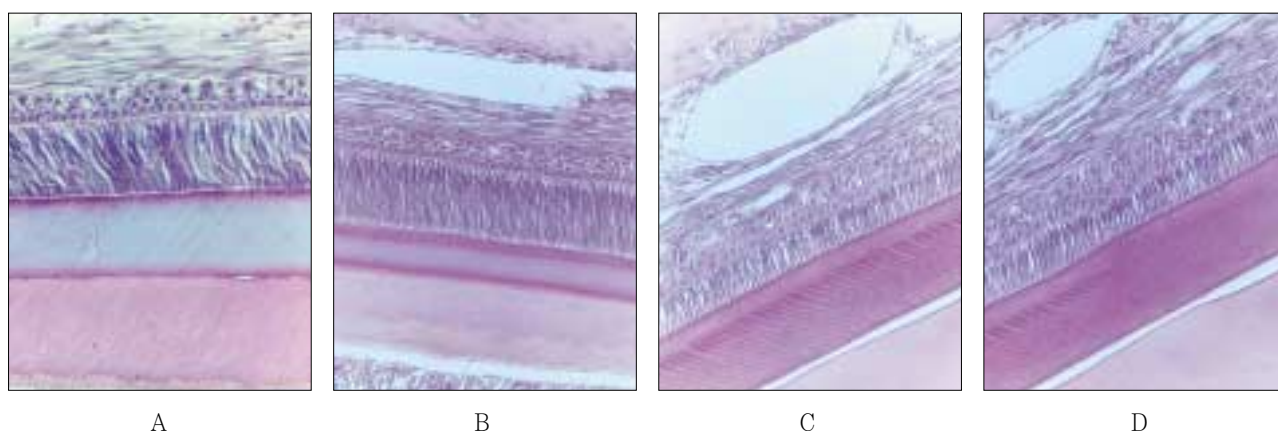


Figure 1. The various functional stages of the ameloblast. *Panel A*, Ameloblast of presecretory stage; *panel B*, Ameloblast of secretory stage; *panel C*, Smooth-ended ameloblast of maturative stage; *panel D*, Ruffle-ended ameloblast of maturative stage.

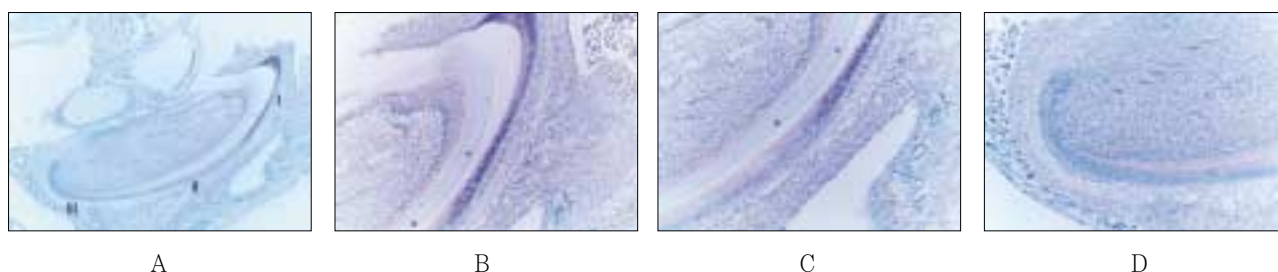


Figure 2. Mandibular incisor of 3-week-old mouse hybridized with antisense cRNA probes of OD314. *Panel A*, Low magnification micrograph showing OD314 mRNA expression; *panel B*, High power view of zone I in *panel A*; *panel C*, High power view of zone II in *panel A*; *panel D*, High power view of zone III in *panel A*.

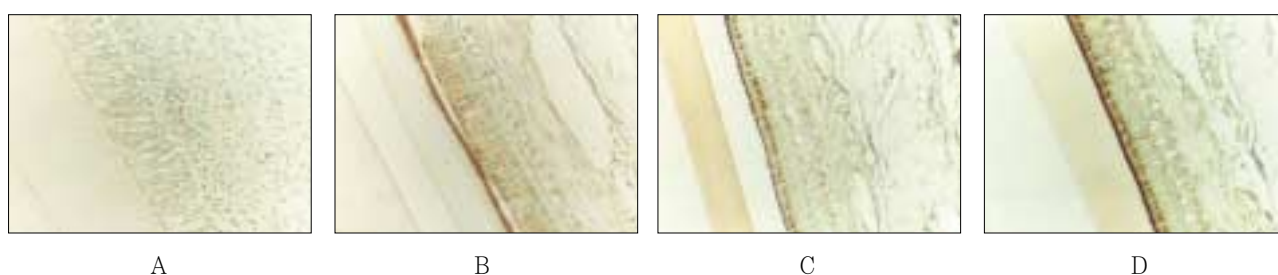


Figure 3. Immunohistochemical localization of OD314 in the various functional stages of ameloblast. *Panel A*, Ameloblast of presecretory stage; *panel B*, Ameloblast of secretory stage; *panel C*, Smooth-ended ameloblast of maturative stage; *panel D*, Ruffle-ended ameloblast of maturative stage.

단계 법랑모세포들이 관찰되었고, 치아의 중앙부 (영역 II)에서는 분비전단계와 분비기의 법랑모세포들이 관찰되었으며, 치관부 (영역 III)에서는 성숙기의 법랑모세포들이 관찰되었다.

In-situ hybridization 실험에서 OD314 mRNA는 법랑모세포의 분비기에서부터 발현되기 시작하여 법랑모세포가

성숙해갈수록 그 발현이 증가하는 소견을 보였다 (Figure 2B, C & D).

면역조직화학적 분석에서 OD314 단백질은 분비전단계의 법랑모세포에서는 발현되지 않다가, 분비기의 법랑모세포에서는 세포질의 중앙부위에서 원심 쪽으로 산재된 형태의 약한 발현을 나타냈다 (Figure 3A & B). 반면에 성숙

기의 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포에서는 OD314가 강하게 발현되었다. OD314는 세포의 중앙 부위와 형성된 법랑질에 인접한 세포질의 원심끝단에서 특히 강하게 발현되었으며, 발현 정도는 주름끝 법랑모세포에서 더욱 뚜렷한 소견을 보였다 (Figure 3C & D).

IV. 총괄 및 고안

미분화한 세포가 특정세포로 분화하는 과정에는 특별한 전사인자 (transcription factor)나 분화 유도인자 (differentiation factor)가 중추적인 역할을 한다. 신체의 경조직을 구성하는 세포들 중에서 골모세포를 제외하고 상아모세포와 법랑모세포 그리고 백악모세포의 분화를 조절하는 인자에 관하여는 잘 알려져 있지 않다¹¹⁻¹³. 최근 들어 다양한 세포들의 분화 유도인자를 동정할 목적으로 각각의 분화한 세포들이 갖는 독특한 세포-특이적 유전자들에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁴. Nakashima 등¹⁵은 골격근 전구세포인 C2C12 세포주에 BMP-2 (bone morphogenic protein-2)를 투여하여 골격근 전구세포를 골모세포로 분화시킨 후 분화된 골격근 전구세포와 골모세포의 유전자를 subtraction 법으로 비교하여 골모세포-특이 단백질인 osterix를 동정하였고, 기능 분석을 통하여 osterix가 Runx2 / CBFA1과 더불어 골모세포의 분화와 막내골화 그리고 연골성 골화를 조절하는 분화유도 인자라고 하였다.

Dentin sialophosphoprotein (DSPP)은 비교원질성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로, 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein (DPP)의 두 가지 단백질을 합성한다¹⁶⁻²¹. 그러나, Sreenath 등²²은 상아모세포-특이 유전자로 널리 알려진 DSPP는 골모세포의 osterix와는 달리 상아질의 석회화 과정에는 중요한 역할을 하나, 상아모세포의 분화를 조절하거나 유도하는 인자로는 볼 수 없다고 하여, 상아모세포의 분화에 관여하는 현재까지 알려지지 않은 또 다른 상아모세포-관련 유전자나 특이 유전자 연구의 존재 가능성을 암시하였다.

최근에 Dey 등⁷이 상아모세포-특이 유전자를 새롭게 찾아내고 이를 상아모세포 분화과정에 분자생물학적으로 응용할 목적으로, 상아모세포 / 치수세포의 유전자를 subtraction 법으로 선별하여 OD314를 상아모세포 특이 유전자로 보고하였다. 그러나, 김¹⁰은 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하였다. 이는 OD314를 동정하는 과정에서 법랑모세포-특이 유전자인 amelogenin이 Dey 등⁷이 보고한 상아모세포-특이 유전자 군에 포함되어 있었던 것으로 보아, subtraction을 위하여 상아모세포 / 치수세포군 조직

을 분리할 때 법랑모세포가 일부 포함되어 있었던 것으로 생각된다. 결과적으로 상아모세포-특이 유전자군에 법랑모세포 관련 유전자들이 섞여 있게 되었고, OD314가 상아모세포 뿐만 아니라 법랑모세포에서도 발현된 것으로 보인다.

치아 발생과정에서 법랑모세포의 분화는 순차적인 상피-간엽 상호작용에 의하여 조절되나, 그 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다²³. 법랑질은 치아기 (dental organ)에 의해서 만들어지는데, 치아기는 중심부의 성상세망세포 (stellate reticulum), 치유두와 인접한 부위에 내치상피세포 (internal dental epithelium), 성상세망세포와 내치상피세포 사이에 입방형의 한 층의 세포들로 구성된 중간층 (stratum intermedium), 그리고 외치상피 (external dental epithelium)로 구성되어 있다. 내치상피세포가 법랑질을 분비하는 법랑모세포로 분화하는 데에는 상아모세포와 상호작용이 필수적이며, 분화에서 법랑질 형성과 소실까지 복잡한 생활 주기 (life cycle)를 보인다¹. 법랑모세포의 생활 주기는 입방형의 키가 작은 내치상피의 형태발생기 (morphogenetic stage), 핵이 근심부에 위치하며 원주형으로 키가 큰 내치상피의 조직분화기 (histodifferentiation stage), Tomes' 돌기가 없는 법랑모세포의 초기-분비기 (initial-secretory stage), Tomes' 돌기가 있는 법랑모세포의 분비기 (secretory stage), 주름끝 (ruffle-ended) 법랑모세포의 성숙기 (maturative stage) 및 평탄끝 (smooth-ended) 법랑모세포의 성숙기이다. 이러한 분화과정 동안 법랑모세포는 세포끼리 긴밀하게 결합하고 다양한 물질을 분비하며, 또한 수많은 유전자와 단백질 그리고 다른 세포들과의 상호작용을 하게 된다².

본 실험에서 OD314 mRNA는 법랑모세포의 분비기에서부터 발현되기 시작하여 법랑모세포가 성숙해갈수록 그 발현이 증가하는 소견을 보였고, OD314 단백질도 분비단계의 법랑모세포에서는 발현되지 않고 분비기의 법랑모세포에서는 세포질에 약한 발현을 보이다가 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포에서는 강하게 발현되었다. 이 결과는 OD314가 법랑모세포의 성숙과정 즉 유기기질을 제거하고 석회화를 증진하는 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포의 기능과 깊은 관련이 있음을 의미한다.

주름끝 법랑모세포는 세포의 원심 끝단에 세포주름을 형성하여 미성숙 법랑질로부터 유기기질을 제거하고, 평탄끝 법랑모세포는 세포의 근심 끝단에서부터 칼슘 이온을 형성 중인 법랑질 쪽으로 이동시키어 결과적으로 법랑질을 석회화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁴. 본 실험에서 OD314 단백질의 분포를 보면 분비기 법랑모세포에서는 세포질 전체에 퍼져 있다가, 평탄끝 법랑모세포에서는 세포질의 근심부에서 강하게 발현되고, 주름끝 법랑모세포에서는 세포질의 원심부와 근심부에서 모두 강하게 발현되는 소견

을 보였다. 이는 OD314 단백질이 세포질내에서 세포의 기능 변화에 따라 이동하는 물질로 생각할 수 있다. 법랑모세포의 분비기와 성숙기의 단계 변화에 따른 OD314의 세포내 이동으로 보아 OD314는 크게 세포의 두 가지 기능과 관련하여 생각 할 수 있다. 첫째는 OD314가 세포내 다른 단백질의 이동과 관련하여 기능할 것이라는 가설로, 분비기 법랑모세포에서 세포질에 퍼져 있지만 핵에 근접한 부위 즉 단백질합성이 시작되는 부위에 많이 분포한다는 사실과 분비가 끝나고 성숙기가 되면 세포막 인접부 같은 세포질의 특정 부위에 많이 분포하는 사실이 이를 뒷받침한다. 두 번째는 OD314 단백질이 법랑질의 석회화와 연관하여 어떤 기능을 할 것이라는 가설로, 성숙기에서 평탄끝과 주름끝 법랑모세포의 칼슘 이동 경로와 동일한 양상으로 OD314가 분포하는 사실이 이에 부합한다. 이를 명확히 하기 위해서는 다양한 분화단계의 법랑모세포들에서 전자현미경을 이용한 immuno-gold 표지법으로 세포질내에서 OD314의 초미세구조적 분포를 관찰하는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

법랑모세포의 분화과정에서 OD314의 기능을 연구하기 위해서는 법랑모세포를 실험실에서 자유롭게 배양할 수 있어야, 이를 통하여 OD314의 세포내 주입과 같은 다양한 실험이 가능하다. 현재까지 알려진 법랑모세포의 배양 방법은 두 종류이다. 첫째는 법랑모세포를 조직에서 얻어 일차 배양하는 방법이 있으나 이는 세포가 오래 생존하지 못하기 때문에 이용에 한계가 있다²⁵⁾. 둘째 방법은 현재 알려진 세포주를 이용하는 것인데 이들 세포주는 T-항원이나 SV40과 같은 바이러스성 oncogene을 이용하여 불멸화한 것들이어서 이런 oncogene들에 의한 세포 손상과 특성 변화가 초래될 수 있다는 문제점이 있다²⁶⁾. 그러나, 최근에 Nakata 등²⁷⁾이 자연적으로 불멸화되고 실험실내 배양과 생체적용에서 법랑모세포의 특성을 그대로 나타내는 법랑모세포주를 보고한 바 있다.

결론적으로 본 실험 결과로 보아 OD314는 법랑모세포의 분화와 성숙과정에서 세포질 내부에서 특징적인 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나, 법랑모세포에서 OD314의 기능을 명확히 하기 위해서는 법랑모세포의 특성을 나타내는 법랑모세포주를 이용한 OD314 유전자의 발현 억제와 과발현과 같은 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치아 발생과정에서 법랑모세포의 분화는 순차적인 상피-간엽 상호작용에 의하여 조절되나, 분화나 성숙과정의 정확한 기전은 아직 까지 잘 알려져 있지 않다. 최근에 상아모세포에서 처음 발견된 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다

고 하였다.

이에 본 연구에서는 생쥐 하악 전치의 다양한 시기의 법랑모세포를 이용하여, 형태학적 분석과 *in-situ* hybridization에 의한 OD314 mRNA의 발현 그리고 OD314 항체를 이용한 면역조직화학적 분석을 통하여 OD314 유전자의 법랑모세포 분화와 성숙과정에서의 역할을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 형태학적으로 법랑모세포는 분화 단계에 따라 분비 전단계 법랑모세포, 분비기 법랑모세포, 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 성숙기의 주름끝 법랑모세포로 구분되었다.
2. OD314 mRNA는 분비기의 법랑모세포에서부터 발현되기 시작하여 법랑모세포가 성숙해갈수록 그 발현이 증가하였다.
3. OD314 단백질은 분비 전단계의 법랑모세포에서는 발현되지 않고, 분비기의 법랑모세포에서는 세포질에 전체적으로 발현되었다. 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포에서는 세포의 근심과 원심끝단에 OD314 단백질이 강하게 발현되었다.

이상의 결과를 종합하여 OD314는 법랑모세포의 분화와 성숙과정에서 세포질 내부에서 특징적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Garant PR. Oral cells and tissues. Quintessence Publishing Co., Inc., Chicago, IL, p25-52, 2003.
2. Nancy A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, p192-239, 2003.
3. Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 231:758-765, 2004.
4. Millar SE, Koyama E, Reddy ST, Andl T, Gaddapara T, Piddington R, Gibson CW. Over- and ectopic expression of Wnt3 causes progressive loss of ameloblasts in postnatal mouse incisor teeth. *Connective Tissue Res* 44:124-129, 2003.
5. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:128-161, 1998.
6. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signalling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 7:719-730, 2004.
7. Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Archiv Oral Biol* 46:249-260, 2001.
8. 김두현, 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. 상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능 연구. *대한치과보존학회지* 29(4): 399-408, 2004.
9. 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현억제가 상아모세포 전구세포에 미치는 영향. *대한체질인류학회지* 17(2):121-129, 2004.
10. 김익환. 상아모세포 분화과정에서 OD314의 역할. 조선대학교 박사학위 논문, 2005.

11. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perret-Mabillon B, Boudeulle M, Maloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cell in explant culture. *Calcif Tissue Int* 66:129-138, 2000.
12. D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, Macdougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*. *J Bone Miner Res* 12:2040-2049, 1997.
13. Gaikwad GS, Hoffman M, Cavender A, Bronskers AL, D'Souza RN. Molecular insights into the lineage-specific determination on odontoblasts: the role of CBFA1. *Adv Dent Res* 15:19-24, 2001.
14. Buchaills R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel gene expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 19:421-430, 2000.
15. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29, 2002.
16. Butler WT. Dentin matrix protein. *Eur J Oral Sci* 106(Suppl 1):204-210, 1998.
17. Butler WT. Dentin-specific protein. *Methods in Enzymol* 145:290-303, 1987.
18. Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'souza RN, Farach-carson MC, Hartha RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Somerman MJ, Foster RA, Tomana M, Djik SV. Isolation, characterization immunolocalization of a 53-KDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 12:343-351, 1992.
19. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 272(2):835-842, 1997.
20. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30(2):377-385, 2002.
21. Shimo T, Wu C, Billings PC, Piddington R, Rosenbloom J, Pacifici M, Koyama E. Expression, gene regulation, and roles of Fisp 12/CTGF in developing tooth germs. *Dev Dyn* 224(3):267-278, 2002.
22. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentonogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278(27):24874-24880, 2003.
23. Calvi LM, Shin HI, Knight MC, Weber JM, Young MF, Giovannetti A, Schipani E. Constitutively active PTH/PTHrP receptor in odontoblasts alters odontoblast and ameloblast function and maturation. *Mech Dev* 121:397-408, 2004.
24. Kawamoto T, Shimozu M. Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem* 45:213-230, 1997.
25. Kukita A, Harada H, Kukita T, Inai T, Matsuhashi S, Kurisu K. Primary and secondary culture of rat ameloblasts in serum-free medium. *Calcif Tissue Int* 51:393-398, 1992.
26. Chen LS, Couwenhoven RI, Hsu D, Luo W, Snead ML. Maintenance of amelogenin gene expression by transformed epithelial cells of mouse enamel organ. *Arch Oral Biol* 37:771-778, 1992.
27. Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 308:834-839, 2003.

국문초록

법랑모세포 분화와 성숙과정에서 OD314의 발현

박주철¹ · 안성민¹ · 김흥중¹ · 정문진¹ · 박민주¹ · 신인철¹ · 손호현^{2*}

¹조선대학교 치과대학 구강조직학교실 및 BK21, ²서울대학교 치과대학 치과보존학교실

법랑모세포는 법랑질을 형성하고 유지하는 세포로, 법랑질의 유기기질을 분비하고 법랑질 석회화 과정에도 관여한다. 치아 발생과정에서 법랑모세포의 분화는 순차적인 상피-간엽 상호작용에 의하여 조절되나, 분화나 성숙과정의 정확한 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 최근에 상아모세포에서 처음 발견된 OD314가 치아 발생과정에서 상아질을 형성하는 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하였다.

이에 본 연구에서는 생쥐 하악 전치의 다양한 시기의 법랑모세포를 이용하여, 형태학적 분석과 *in-situ* hybridization에 의한 OD314 mRNA의 발현 그리고 OD314 항체를 이용한 면역조직화학적 분석을 통하여 OD314 유전자의 법랑모세포 분화와 성숙과정에서의 역할을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 형태학적으로 법랑모세포는 분화 단계에 따라 분비 전단계 법랑모세포, 분비기 법랑모세포, 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 성숙기의 주름끝 법랑모세포로 구분되었다.
2. OD314 mRNA는 분비기의 법랑모세포에서부터 발현되기 시작하여 법랑모세포가 성숙해갈 수록 그 발현이 증가하였다.
3. OD314 단백질은 분비 전단계의 법랑모세포에서는 발현되지 않고, 분비기의 법랑모세포에서는 세포질에 전체적으로 발현되었다. 성숙기의 평탄끝 법랑모세포와 주름끝 법랑모세포에서는 세포의 근심과 원심끝단에 OD314 단백질이 강하게 발현되었다.

이상의 결과를 종합하여 OD314는 법랑모세포의 분화와 성숙과정에서 세포질 내부에서 특징적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

주요어: 법랑모세포, OD314, 분화, 성숙, 평탄끝, 주름끝