

Nuclear factor I-C가 치근발생 과정에서 Hertwig's 상피초 형성에 미치는 영향

신인철 · 박주철 · 정문진 · 오현주 · 박선화* · 이창섭** · 김흥중*

조선대학교 치과대학 구강조직학교실 및 BK21, *구강해부학교실, **소아치과학교실

국문초록

치아의 형성은 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정이다. 지금까지 치관의 발생에 관여하는 유전자 및 그들의 신호전달경로에 관한 연구는 다수 진행되어 왔지만 치근의 발생을 조절하는 기전에 대해서는 별로 알려진 것이 없다. 최근에 NFI-C knock out 생쥐에서 정상치관에 비정상적인 치근을 가지는 치아가 보고되었다.

본 연구의 목적은 NFI-C가 어떻게 치근의 형태와 상아모세포의 분화에 관여하는지를 규명하는 것이다. NFI-C knock out 생쥐의 치근 발생동안에 HERS의 역할을 연구하고자 cyokeratin 면역조직화학적방법과 치근상아질의 특성을 규명하기 위해 DSPP mRNA *in-situ* hybridization법을 수행하였다.

1. NFI-C knock out 생쥐의 치근형성시 HERS의 역할

Wild type과 knock out type 모두에서 cyokeratin은 모든 HERS 세포들과 반응하였고, HERS와 법랑상피 사이의 양성반응세포들의 연속성은 치경부 부위에서 소실되었다. Knock out type에서 치근상아질이 침착된 후, cyokeratin 양성-HERS 세포들은 치경부에서 불규칙한 배열과 극성의 상실을 보였다.

2. NFI-C knock out 생쥐의 치근상아질의 특성

DSPP mRNA의 발현은 wild type에서 치관과 치근상아질의 상아모세포 모두에서 강한 발현을 보인 반면, knock out type에서는 치관부위 상아질의 상아모세포에서만 강한 발현을 보였다.

3. NFI-C knock out 생쥐의 치근 발생과정에서 HERS는 치관으로부터 정상적인 확장을 보인 반면, 치근부위에서의 상아모세포 분화는 실패하였다.

위의 결과들로 보아 NFI-C는 치근형성 과정에서 상아모세포 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

주요어 : NFI-C knockout, 상아모세포분화, 치근형성, Cytokeratin, DSPP

I. 서론

치아의 형성은 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정이다. 현재까지 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 수준까지 많이 진행되어 왔다. 초기의 치아발생에는

BMP, FGF, Msx1, Pax9 및 Cbfa1 등의 여러 유전자들이 관여하며 그들의 신호전달경로들이 밝혀졌다. 이와 같이 치아발생의 여러 단계에서 발현되는 많은 유전자들의 역할이 밝혀졌고 유전자 조작을 이용한 연구도 상당히 진행되어 왔다¹⁻⁵⁾. 치아의 초기 발생과는 대조적으로 후기 치아발생, 즉 치근의 발생에 관여하는 인자들의 연구는 cadherin 같은 부착단백질과 osteocalcin, osteonectin 및 dentin sialoprotein 등과 같은 비교원성 단백질과 관련된 연구를 제외하고는 아직까지 알려진 것이 별로 없다^{6,7)}. 치근의 발생기전의 이해는 치주조직의 재생뿐만 아니라 의도적 치아의 재이식 등의 임상적 적용에 중요하

교신저자 : 김 흥 중

광주광역시 동구 서석동
조선대학교 치과대학 구강해부학교실
Tel : 062-230-6875
E-mail : hjbkim@chosun.ac.kr

* 위 연구는 조선대학교 연구년제 해외과건(2001년) 지원에 의하여 이루어진 것임.

기 때문에 치근의 발생에 대한 연구는 기초치의학 뿐 아니라 임상적으로도 매우 중요하다 하겠다.

Nuclear factor I(NFI)은 포유류에서 NFI-A, -B, -C와 -X의 4종류가 존재하며, 많은 세포의 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. Chaudhry 등⁸⁾과 Steele-Perkins 등¹¹⁾은 NFI의 기능을 규명하기 위해 knockout mice(K/O) 모델을 이용한 실험에서 NFI-A는 뇌의 성장결합, NFI-C는 허파의 성장장애, NFI-C는 치관만 존재하고 치근이 없는 치아의 이상을 나타낸다고 보고하였다.

Steele-Perkins 등¹¹⁾은 wild type과 NFI-C K/O type mice의 조직표본을 만들어 관찰한 결과, K/O type에서 발육부전을 보이는 치근을 가진 절치와 정상치관을 가지나 치근이 형성되지 않은 구치를 관찰하여, NFI-C가 치아 발생과정 중에 말기, 즉 치근형성시기에 중요한 역할을 할 것이라 하였다. 이들은 또 처음부터 치근이 형성이 되지 않은 것이 아니라 초기에 형성된 치근이 차츰 짧아져서 쉽게 깨지고 파괴된다는 사실을 확인하였다.

치근의 발생은 치관상아질이 형성되고 난 다음에 치관의 치경부에서 내치상피(internal enamel epithelium)와 외치상피(external enamel epithelium)의 두 층으로 이루어진 Hertwig's 상피초(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)가 확장되어 상피성 격막을 만드는 것으로 시작된다^{12,13)}. HERS는 치근 발생과 관련하여 두 가지의 중요한 역할을 한다. 첫째는 치근의 모양, 즉 외형을 결정하는 것이고, 둘째로 치유두의 세포들을 상아모세포로 분화시켜 치근상아질을 형성하는데 관여한다¹⁴⁻¹⁶⁾. 치근상아질이 형성된 다음 HERS는 상피의 연속성이 파괴되고 그 사이로 치낭(dental follicle)의 세포들이 새로 형성된 상아질쪽으로 이동하여 백악질의 형성에 관여하는 백악모세포로 분화하게 된다^{13,17-19)}.

따라서 NFI-C K/O mice의 치근 발생과정 중에 어느 시기에 문제가 생겨 치근의 형성 장애가 발생하는지를 규명하는 것은 매우 중요하다 하겠다. 즉, HERS가 치관으로부터 확장되어 치근외형을 만드는 과정에 문제가 생기는 것인지, HERS가 정상적으로 형성되고 난 후에 치유두의 세포들이 상아모세포로 분화하는 과정에 문제가 생기는지를 확인하는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 NFI-C가 치근 발생단계의 어느 시기에 영향을 주는지를 알아보기 위해 첫째, HERS의 형성과 역할을 알아보고자 면역조직화학적방법을 이용하여 상피특이 단백질(epithelium specific protein)인 cytokeratin의 발현을 확인하였고, 둘째 NFI-C K/O mice에서 형성부전을 보이는 치근부분의 세포학적 특성을 분석하기 위해서 *in-situ* hybridization법을 이용하여 상아모세포 분화특이 표지자(marker of odontoblastic differentiation)인 DSPP의 발현을 확인하였다²⁰⁾. NFI-C K/O mice의 치근의 형성과정과 특성을 세포학적 수준에서 연구함으로써 치근 형성과정에 관여하는 NFI-C의 조절기전을 규명하는데 중요한 자료가 되리라 사료된다.

II. 연구재료 및 방법

1. 조직표본제작

생후 14일의 wild type과 NFI-C K/O mice를 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정 시킨 후 상, 하악골을 포함한 머리뼈를 적출하여 동일 고정에서 하루밤 동안 재 고정하였다. 10% EDTA-1% paraformaldehyde(pH 7.4) 용액에서 2주간 탈회하고 수세, 탈수 등의 과정을 거친 다음 파라핀 포매하여 8 μ m 두께로 전치부에서부터 구치부까지 전방에서 후방으로 관상으로 박절하였다. 박절한 절편은 면역조직화학적 염색과 mRNA *in-situ* hybridization에 사용하기 위해 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2. 면역조직화학적염색

보관된 절편을 탈파라핀과 합수과정을 거친 다음에 0.6% H₂O₂가 함유된 methanol 용액에 20분간, 2% non fat milk로 20분간 순서대로 처리하였다. 1:100의 비율로 희석한 polyclonal rabbit anti-human cytokeratin (DACO Corporation, Carpinteria, CA, USA)을 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤 처리하고 PBS로 200분 동안 3회 세척하였다. 2차 항체로서 goat anti rabbit IgG (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 45분 동안 처리하고 PBS로 수세하였다. ABC kit (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 30분 동안 반응시킨 후 수세하였다. 0.05% DAB (deaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색하고 절편을 수세, 탈수와 건조 후에 봉입하였다.

3. mRNA *In-situ* hybridization

DSPP cDNA를 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.

절편을 탈파라핀과 합수후에 Proteinase K(5-100ug/ml)로 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하였다. 4% PFA(20분), 0.2N HCL (20분), 0.1M Triethanolamine-HCl(3분)에 처리 후에 탈수하였다.

DSPP cRNA probe를 50 $^{\circ}$ C에서 16시간 hybridization 하였다. Hybridization 후 절편을 세척하고 anti-Dig antibody를 1:100으로 Dig buffer I(100 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl)에 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하였다. Dig buffer II(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM MgCl₂)로 세척하고 NBT/ BCIP로 발색하고 Dig buffer IV(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)로 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. NFI-C K/O 생쥐의 치근형성시 HERS의 역할

(Immunohistochemistry를 이용한 Cytokeratin 단백질의 발현)

구치의 치근형성과정에서 HERS의 형성과정동안 NFI-C의 역할을 형태학적으로 규명하기 위해서 상피 특이 단백질인 cy-tokeratin을 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

HERS가 분화하기 시작한 격막의 끝부분에서는 HERS 세포들의 배열모양이 두 type 모두에서 규칙적인 모양을 보였으나 치경부에서 신장된 HERS를 따라 상아모세포가 분화하여 치근상아질을 형성하는 부위에서는 미세한 차이를 보였다. Wild

type에서는 새로 형성된 상아질 면을 따라 규칙적인 배열을 보였으나 K/O type에서는 거친 형태의 치근상아질과 일관성이 결여된 HERS 세포들이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

Cytokeratin 단백질을 이용하여 HERS의 연속성을 관찰한 결과 wild type과 K/O type 모두에서 HERS 세포들에 cy-tokeratin은 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 1A, 2A). HERS 세포와 내, 외치상피(internal & external enamel epithelium)에서 반응하는 cytotkeratin의 연속성은 치근상아질이 형성됨과 동시에 치경부 부위에서부터 상실되었다. 특히 K/O type에서 치경부에서 연속성이 상실된 형태는 최근에 형성된 치근상아질면에 불규칙한 모양으로 배열되기 시작하였다(Fig. 2B).

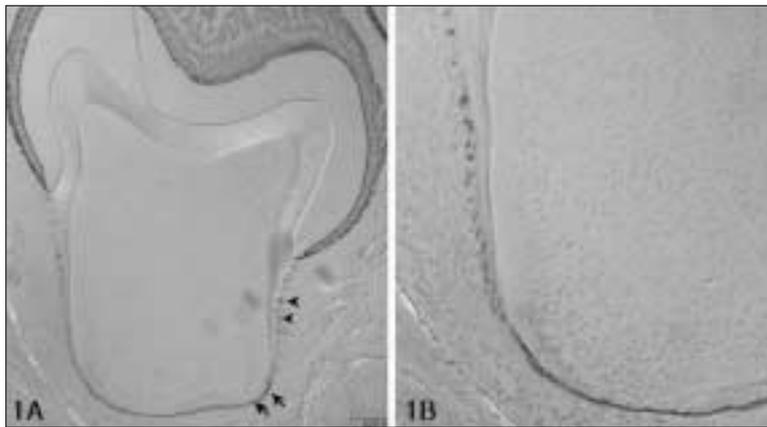


Fig. 1. Immunohistochemical localization of cytotkeratin during root development of wild type. (A): Cytokeratin reacts with all the HERS cells(arrows) and the continuity of cytotkeratin positive cells between the HERS cells and inner and outer enamel epithelium is lost in the cervical region(arrowheads). (B): Magnified photograph of A.

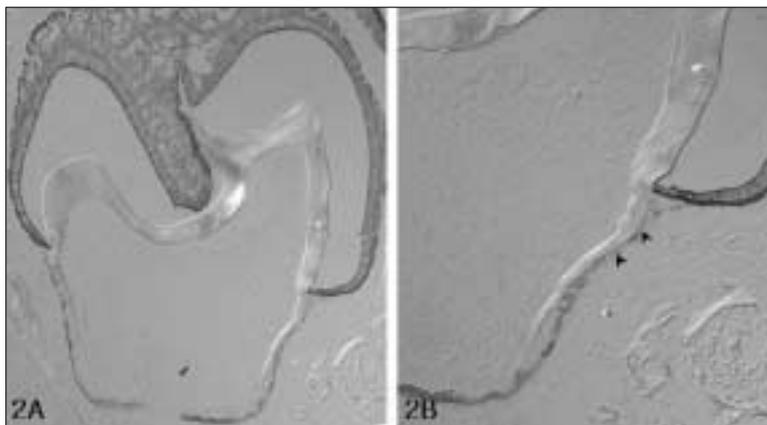


Fig. 2. Immunohistochemical localization of cytotkeratin during root development of NFI-C K/O mice. (A): Overall expression patterns of cytotkeratin positive cells are same as Fig. 1. (B): Magnified photograph of A, cytotkeratin positive HERS cells shows irregularity and loss of polarity in the cervical region(arrowheads).

지속적인 치근의 성장을 보이는 절치(incisor)에서의 cytokeratin의 반응을 관찰한 결과, wild type에서는 원형으로 형성된 정상적인 상아질이 주위에는 cytokeratin에 반응하는 세포들은 관찰되지 않았다(Fig. 3A). NFI-C K/O type의 절치는 wild type과 비교해서 발육이 늦은 상태로 치관부위의 새로 형성된 상아질은 불규칙한 모양으로 상아모세포가 매몰된 형태를 보였다. 치근부분은 상아질의 연속성이 파괴되어 뚫린 비정상적인 형태였으며, 아직 비정상적인 변화가 약한 부위의 HERS와 내, 외치상피들은 cytokeratin에 양성반응을 보였다(Fig. 3B).

2. NFI-C K/O 생쥐의 치근상아질의 특성
(*In-Situ* hybridization법을 이용한 DSPP mRNA의 발현)

NFI-C K/O 생쥐에서 발육이상을 보이는 치근상아질의 세포학적 특성을 형태세포학적으로 규명하기 위해서 상아모세포 특이 유전자인 DSPP의 발현을 *in-situ* hybridization법을 이용하여 관찰하였다.

NFI-C K/O type의 치근의 길이는 wild type과 비교해서 짧아진 소견을 보였다(Fig. 4A, B). DSPP의 발현은 wild type에서는 치관과 치근상아질의 상아모세포 모두에서 강한 발현을 보였다(Fig. 4A).

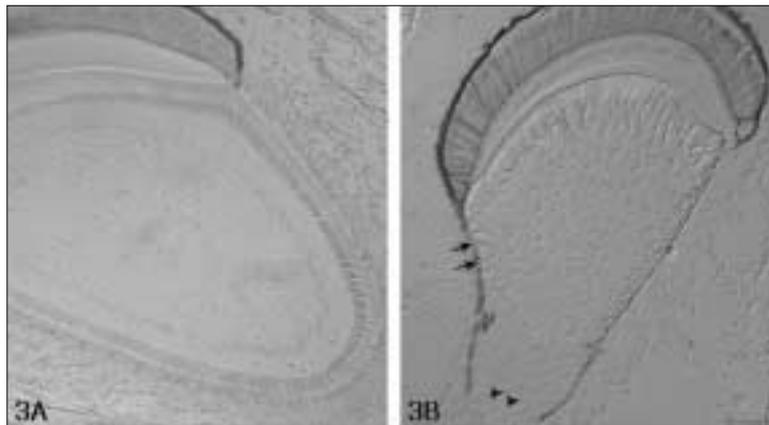


Fig. 3. Immunohistochemical localization of cytokeratin in developing incisor of wild type (A) and NFI-C K/O (B) mice. (A): Cytokeratin reacts with dental epithelium only. (B): Cytokeratin reacts with the HERS cells(arrows) and the continuity of cytokeratin positive cells is lost in the region of deformed root(arrowheads).

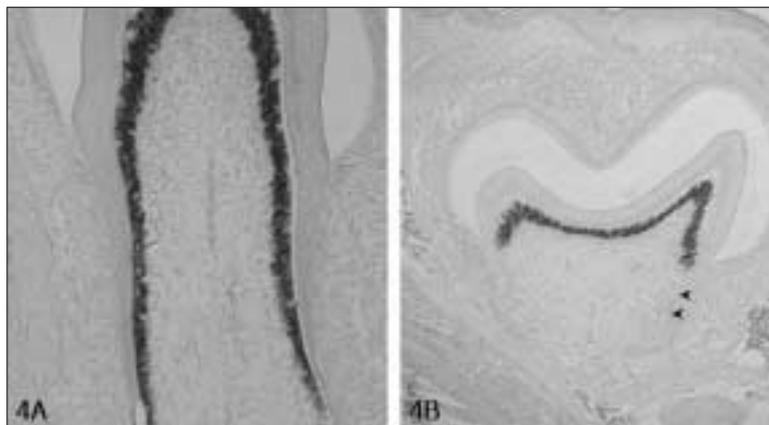


Fig. 4. Expression of DSPP mRNA during root development of wild type (A) and NFI-C K/O (B) mice. (A): Expression of DSPP mRNA was detected in odontoblasts of crown and root dentin. (B): DSPP mRNA was expressed in odontoblast of crown region only, not in cells of root(arrowheads).

NFI-C K/O type의 치아에서는 아주 흥미로운 모양을 보였다. 내법랑상피와 접했던 치관부 상아질의 상아모세포에서만 강한 발현을 보였고, 형성부전을 보이는 HERS와 접했던 치근부의 세포들에서는 반응을 보이지 않았다(Fig. 4B). 또한 DSPP에 음성반응을 보인 세포들은 불규칙한 배열과 형성부전을 보이는 경조직에 매몰된 형태를 보였다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치근형성은 치관상아질이 형성된 다음, 법랑기의 가장자리인 치경부 부분에서 내, 외법랑상피가 증식하여 Hertwig's 상피초(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)가 형성됨으로써 시작된다. 법랑질의 기질 형성이 종료되면, 치경부에서 법랑기의 상피가 장차 치근이 될 부위로 증식하여 HERS가 된다. HERS는 법랑기에서 연속하는 내, 외법랑상피로만 이루어지는데 백악상아경계를 규정하고, 장래의 치근의 외형과 크기를 결정하는 중요한 역할을 한다. 또한 치유두의 세포로부터 상아모세포를 분화시켜 치근상아질 형성을 유도한다^{12-14,16)}.

Steele-Perkins 등¹¹⁾은 nuclear factor I-C(NFI-C)의 기능을 평가하기 위해서 NFI-C knockout 생쥐를 만들어 전체 장기의 표본을 검사하였다. 그들은 주요 소견으로 정상보다 작아진 악골, 심한 기형을 보이는 절치, 치관만이 형성되고 치근이 없는 구치 등을 보고하며, NFI-C가 치아발생 과정 중에 말기, 즉 치근형성시기에 관여한다고 하였다. 이에 Yamamoto 등¹⁸⁾은 치근형성 이상을 세포학적인 수준에서 규명하고자 Gronostajski 실험실에서 wild type과 NFI-C K/O type의 생쥐를 공급받아 조직표본을 만들어 관찰한 결과, K/O type에서 구치의 치근형성 과정을 관찰하여 그 이전의 보고와 차이를 발견하였다. 처음부터 치근의 형성과정에 문제가 생겨서 치근이 형성되지 않은 것이 아니고 초기에 형성된 치근이 차츰 짧아져서 쉽게 깨지고 파괴된다는 사실을 확인하였다.

HERS의 안쪽에서 분화된 상아모세포는 바로 치근상아질을 형성하기 시작한다. 치근상아질이 형성되면 HERS는 연속성이 끊어지고, 붕괴되어 치낭속으로 유리된다^{12,15,17)}. 이 때문에 치낭은 노출된 상아질에 접하고, 치낭의 미분화간엽세포로부터 백악모세포가 분화하여 상아질위에 백악질을 첨가한다^{14,21-24)}. 백악질형성이 시작되면, HERS는 치근 표면에서 분리, 단절되어 Malassez 상피잔존물(epithelial rest of Malassez)이라고 불리며, 치근막의 백악질쪽에 잔존하는데 교정력이 가해지면 그 수가 증가하는 것으로 보아 치아이동시 치주인대의 교원질 대사에 관여하는 것으로 추측된다²⁵⁾. 백악질 형성에 관여하는 백악모세포의 기원에 대해 최근에 흥미로운 보고가 있다. Zeichner-David 등¹⁹⁾은 초기 치근상아질이 형성된 후, HERS 기원의 백악모세포가 무세포성백악질(acellular cementum)을 분비한 다음, 신경능선세포 기원의 치낭 세포가 분화하여 세포성백악질(cellular cementum)을 침착시킨다고 하였다.

NFI-C K/O mice의 치근 발생과정 중에 어느 시기에 문제

가 생겨 치근의 형성 장애가 발생하는 규명하는 것은 매우 중요하다 하겠다. 치근형성 초기에 HERS가 치관으로부터 확장되어 치근외형을 만드는 과정에 문제가 생기는 것인지, HERS가 정상적으로 형성되고 치유두의 세포들이 상아모세포로 분화하는 과정에 이상이 발생하는 지를 확인하는 것은 치근형성 과정 중에 NFI-C의 역할을 규명하는데 중요한 과제라 하겠다.

본 연구에서는 NFI-C K/O 생쥐에서 치근형성시 초기의 발생에 중요한 역할을 하는 HERS의 형성과 분화를 확인하기 위해서 상피특이 단백질인 cytokeratin을 이용하여 면역조직화학적방법으로 HERS를 관찰하였다.

HERS가 분화하기 시작한 격막의 끝부분에서는 HERS 세포들의 배열모양이 두 type 모두에서 규칙적인 모양을 보였으나 상아모세포가 분화하여 치근상아질을 형성하는 부위를 비교한 조건에서 wild type에서는 새로 형성된 상아질 면을 따라 규칙적인 배열을 보였으나 K/O type에서는 거친 형태의 치근상아질과 일관성이 결여된 HERS 세포들이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

NFI-C K/O type의 절치는 wild type과 비교해서 발육이 늦은 상태로 치관부위의 새로 형성된 상아질은 불규칙한 경조직 덩어리에 상아모세가 매몰된 형태를 보였다. 치근부분의 상아질은 연속성이 파괴되어 뚫린 형성부전의 모양을 보였고, 아직 비정상적인 변화가 약한 부위의 HERS와 내, 외법랑상피들은 cytokeratin에 양성반응을 보였다(Fig. 3B).

위의 결과들로 보아 NFI-C는 치근형성초기의 HERS의 형성과 상아모세포의 분화에는 영향을 미치지 않고 새로운 상아질이 형성되고 난 다음에 백악질의 분화가 시작되는 시점부터 관여하는 것으로 추측된다.

NFI-C K/O mice의 형성부전을 보이는 치근부분의 세포학적 특성을 확인하기 위해서 상아모세포에 특이적인 DSPP의 발현을 *in-situ* hybridization법을 이용하여 관찰하였다. NFI-C K/O type에서 치근의 길이는 wild type과 비교해서 짧아진 소견을 보였다. DSPP의 발현은 wild type에서는 치관과 치근상아질의 상아모세포 모두에서 강한 발현을 보인 반면에 NFI-C K/O type의 치아에서는 아주 흥미로운 모양을 보였다. 내법랑상피와 접했던 치관부 상아질의 상아모세포에서만 강한 발현을 보였고, HERS와 접했던 치근부의 세포들에서는 DSPP에 전혀 반응을 보이지 않았다(Fig. 4A, B).

DSPP가 치관부위 상아모세포에만 발현되고 치근부위에서는 음성을 보이는 것으로 보아 상아모세포에서 골모세포로 표현형(phenotype)이 변화되고 형성된 조직은 치근상아질 보다는 뼈 또는 그와 유사한 성질의 경조직으로 생각된다. 앞으로 뼈를 형성하는 골모세포에 특이적으로 발현되는 bone sialoprotein(BSP)을 이용하여 비정상발육을 보이는 치근부의 세포들의 성질을 비교함이 필요할 것으로 여겨진다.

위의 결과들을 종합하며 분석하면 NFI-C K/O mice에서 형성부전을 보이는 치근은 발생 과정에서 치근의 외형을 결정짓는 HERS의 치경부에서의 확장 시기에는 정상을 보였고, 치근상아질을 형성하기 위해 치유두의 세포들이 상아모세포로 분화

하는데 문제가 발생하는 것을 발견하였다. 즉, NFI-C는 치근의 발생동안 상아모세포의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

V. 결 론

치아의 형성은 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정이다. 지금까지 치관의 발생에 관여하는 유전자 및 그들의 신호전달경로에 관한 연구는 다수 진행되어 왔지만 치근의 발생을 조절하는 기전에 대해서는 별로 알려진 것이 없다. 최근에 NFI-C knock out 생쥐에서 정상치관에 비정상적인 치근을 가지는 치아가 보고되었다.

본 연구의 목적은 NFI-C가 어떻게 치근의 형태와 상아모세포의 분화에 관여하는지를 규명하는 것이다. NFI-C knock out 생쥐의 치근 발생동안에 HERS의 역할을 연구하고자 cytokeratin 면역조직화학적방법과 치근 상아질의 특성을 규명하기 위해 DSPP mRNA *in-situ* hybridization법을 수행하였다.

1. NFI-C knock out 생쥐의 치근형성시 HERS의 역할

Wild type과 knock out type 모두에서 cytokeratin은 모든 HERS 세포들과 반응하였고, HERS와 법랑상피 사이의 양성반응세포들의 연속성은 치경부부위에서 소실되었다. Knock out type에서 치근상아질이 침착된 후, cytokeratin 양성-HERS 세포들은 치경부에서 불규칙한 배열과 극성의 상실을 보였다.

2. NFI-C knock out 생쥐의 치근상아질의 특성

DSPP mRNA의 발현은 wild type에서 치관과 치근상아질의 상아모세포 모두에서 강한 발현을 보인 반면, knock out type에서는 치관부위 상아질의 상아모세포에서만 강한 발현을 보였다.

3. NFI-C knock out 생쥐의 치근발생 과정에서 HERS는 치관으로부터 정상적인 확장을 보인 반면, 치근부위에서의 상아모세포 분화는 실패하였다.

위의 결과들로 보아 NFI-C는 치근형성 과정에서 상아모세포 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, et al. : Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev*, 101:255-258, 2001.
2. D'Souza RN, Alerg T, Gaikwad J, et al. : Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, 126:2911-2920, 1999.
3. Jiang H, Sodek J, Karsenty G, et al. : Expression of

- core binding factor Osf2/Cbfa-1 and bone sialoprotein in tooth development. *Mech Dev*, 81:169-173, 1999.
4. Peter H, Balling R : Teeth: where and how to make them. *Development*, 15:59-65, 1999.
5. Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. : Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*, 81:695-700, 2002.
6. Obara N, Suzuki Y, Nagai Y, et al. : Immunofluorescence detection of cadherins in mouse tooth germs during root development. *Arch Oral Biol*, 44:415-421, 1999.
7. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, et al. : Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone*, 30:377-385, 2002.
8. Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM : Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn*, 208:313-325, 1997.
9. Elateri I, Muller-Weeks S, Caradonna S : The transcription factor, NFI/CTF plays a positive regulatory role in expression of the hSMUG1 gene. *DNA Repair*, 2:1371-1385, 2003.
10. Gronostajski RM : Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 249:31-45, 2000.
11. Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, et al. : Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mole Cell Biol*, 23:1075-1084, 2003.
12. Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, et al. : Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res*, 298:95-103, 1999.
13. Suzuki M, Inoue T, Shimono M, et al. : Behavior of epithelial root sheath during tooth root formation in porcine molars: TUNEL, TEM, and immunohistochemical studies. *Anat Embryol*, 206:13-20, 2002.
14. Alatlí I, Lundmak C, Hammarstrom L : The localization of epithelial root sheath cells during cementum formation in rat molars. *J Periodontal Res*, 31:433-440, 1996.
15. Bosshardt DD, Nanci A : Hertwig's epithelial root sheath matrix proteins and initiation of cementogen-

- esis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*, 31:184-192, 2004.
16. Nanci A : Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function. 6 ed, Mosby, St. Louis, 2003.
 17. Diekwisch TG : The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*, 45:695-706, 2001.
 18. Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, et al. : Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J Dent Res*, 83:688-692, 2004.
 19. Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, et al. : Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*, 228:651-663, 2003.
 20. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, et al. : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein (DMP1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct development function *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 12:2040-2047, 1997.
 21. Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, et al. : Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res*, 9:833-841, 1994.
 22. Casasco A : Application of immunocytochemistry for detection of proliferating cell populations during tooth development. *Anat Rec*, 245:162-173, 1996.
 23. Onishi T, Okawa R, Murakami H, et al. : Immunolocalization of calbindin D28k and vitamin receptor during root formation of murine molar teeth. *Anat Rec*, 273:700-704, 2003.
 24. Onishi T, Ooshima T, Sobue S, et al. : Immunohistochemical localization of calbindin D28k during root formation of rat molar teeth. *Cell Tissue Res*, 297:503-512, 1999.
 25. 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.

Abstract

EFFECT OF THE NUCLEAR FACTOR I-C ON THE FORMATION OF
HERTWIG' S EPITHELIAL ROOT SHEATH DURING ROOT DEVELOPMENT

In-Cheol Shin, Joo-Cheol Park, Moon-Jin Jeong, Hyun-Ju Oh, Sun-Hwa Park*
Chang-Seop Lee**, Heung-Joong Kim*

*Department of Oral Histology & BK21, *Oral anatomy, **Pediatric Dentistry,
College of Dentistry, Chosun University*

Tooth formation is a complex developmental process that is mediated through a series of reciprocal epithelial-mesenchymal interactions. Several signal pathways and transcription factors have been implicated in regulating molar crown development, but relatively little is known about the regulation of root development. It was reported that NFI-C knockout mice showed abnormal root formation with normal crown.

The aims of this study are to elucidate how the NFI-C regulate the determine of root shape and odontoblasts differentiation. We carried out immunohistochemistry using cytokeratin to investigate the role of Hertwig' s epithelial root sheath and DSPP mRNA in-situ hybridization to conform the nature of root dentin during root development in NFI-C knockout mice.

Cytokeratin reacted with all the HERS cells and the continuity of cytokeratin positive cells between the HERS cells and enamel epithelium was lost in the cervical region both wild and K/O types. After root dentin deposition cytokeratin positive-HERS cells showed irregularity and loss of polarity in the cervical region in K/O type.

DSPP mRNA was strongly expressed in odontoblasts of crown and root dentin in wild type mice, whereas expression of DSPP mRNA was restricted in odontoblast of crown dentin in the K/O type.

During root formation in NFI-C knockout mice, HERS normally grow out of the crown but fail to induce odontoblast differentiation in root portion.

These results suggest that NFI-C may play important roles in odontoblast differentiation during root dentin formation.

Key words : NFI-C knockout, Odontoblast differentiation, Root formation, Cytokeratin, DSPP