



치아 발생과정에서 Smad4의 역할

윤지영 · 백진아 · 조의식 · 고승오

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 구강생체과학연구소, BK21사업

Abstract

Smad4 Mediated TGF- β /BMP Signaling in Tooth Formation Using Smad4 Conditional Knockout Mouse

Chi-Young Yoon, Jin-A Baek, Eui-Sic Cho, Seung-O Ko

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Institute of Oral Bioscience, BK21 Program,
School of Dentistry, Chonbuk National University

Purpose: Smad4 is a central mediator for transforming growth factor- β /bone morphogenetic protein (TGF- β /BMP) signals, which are involved in regulating cranial neural crest cell formation, migration, proliferation, and fate determination. Accumulated evidences indicate that TGF- β /BMP signaling plays key roles in the early tooth morphogenesis. However, their roles in the late tooth formation, such as cellular differentiation and matrix formation are not clearly understood. The objective of this study is to understand the roles of Smad4 *in vivo* during enamel and dentin formation through tissue-specific inactivation of Smad4.

Methods: We generated and analyzed mice with dental epithelium-specific inactivation of the Smad4 gene (*K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*) and dental mesenchyme-specific inactivation of Smad4 gene (*Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*).

Results: In the tooth germs of *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, ameloblast differentiation was not detectable in inner enamel epithelial cells, however, dentin-like structure was formed in dental mesenchymal cells. In the tooth germs of *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* mice, ameloblasts were normally differentiated from inner enamel epithelial cells. Interestingly, we found that bone-like structures, with cellular inclusion, were formed in the dentin region of *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* mice.

Conclusion: Taken together, our study demonstrates that Smad4 plays a crucial role in regulating ameloblast and odontoblast differentiation, as well as in regulating epithelial-mesenchymal interactions during tooth development.

Key words: TGF-beta/BMP, SMAD4, Odontoblast, Ameloblast, Tooth development

원고 접수일 2012년 12월 11일, 원고 수정일 2013년 1월 3일,
게재 확정일 2013년 3월 19일

책임저자 고승오
(561-756) 전주시 덕진구 백제대로 567, 전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면
외과학교실
Tel: 063-250-2113, Fax: 063-250-2089, E-mail: omfskso@jbnu.ac.kr

RECEIVED December 11, 2012, REVISED January 3, 2013,
ACCEPTED March 19, 2013

Correspondence to Seung-O Ko
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chonbuk
National University
567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju 561-756, Korea
Tel: 82-63-250-2113, Fax: 82-63-250-2089, E-mail: omfskso@jbnu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치아의 발생은 크게 개시(initiation), 형태형성(morphogenesis), 분화(differentiation)와 광화(mineralization), 치근의 형성과 맹출(root formation and eruption) 단계의 과정을 통해서 이루어진다. 이러한 과정에는 많은 전사인자(transcriptional factor) 및 성장인자(growth factor), 분비단백질(secretory protein)이 관여하고 있다[1]. 이 중 초기 치아 발생에는 bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF), sonic hedgehog (SHH), paired box gene 9 (Pax9) 등의 여러 유전자들이 관여하며 이러한 유전자들은 발생과정에서 상피와 간엽(mesenchyme)이 상호작용하는 데 있어 치아의 형태형성, 세포행동 방식, 세포증식, 세포고사 등에 영향을 주는 등 중요한 기능을 하고 있다고 알려져 있다[2].

Smad4는 transforming growth factor- β (TGF- β)와 BMP superfamily가 매개하는 세포 내 신호전달 과정의 key mediator로서 신호전달의 핵심적 역할을 담당하며, 두개부 신경능세포(cranial neural crest cell)의 이주, 증식, 분화, 기질합성, 면역반응 등과 같이 다양한 세포의 생리적 기능을 조절하는 다기능성 조절자(multifunctional regulator)로 기능한다고 알려져 있다 [3,4]. 초기 발생과정에서부터 Smad4가 원천적으로 제거되어 있는 *Smad4*^{-/-} 생쥐는 임신 후 7.5~8.5 (E7.5~E8.5)일에 사망하므로 E10.5일경부터 시작하는 치아의 초기발생이나 기관형성에 있어서 Smad4의 기능적인 역할을 연구하는 데 부적합하다[5]. 따라서 치아 발생 연구를 위해서는 유전자 적중 시스템인 Cre-LoxP 시스템의 적용이 필수적이며, 이는 특정조건하에서만(time/site-specific) 유전자 적중이 일어나는 ‘Conditional Knockout Strategy’로 개발된 방법으로[6,7] 현재 많은 연구자들이 이용하고 있다.

본 실험에서는 TGF- β /BMP superfamily의 key mediator인 Smad4의 유전자가 LoxP site로 floxed된 생쥐(mouse)를 K14-Cre, Osr2Ires-Cre transgenic mouse와 교배하여 Smad4 유전자를 치아 발생과정에서 각각 상피(K14-Cre)와 두개부 신경능세포에서 유래된 외배엽성 중간엽세포로 이루어진 치성간엽(Osr2Ires-Cre)에서 특이적으로 제거함으로써 치아 발생 과정에서 Smad4

매개 TGF- β /BMP signal의 역할을 밝히고자 하였다.

연구방법

모든 동물실험은 전북대학교동물실험윤리위원회의 심의를 통과하였다.

1. 연구 대상

치아발생 중의 상피와 간엽에서 Smad4 유전자 적중을 실시하기 위해 *Smad4*^{fl/fl} mouse를[8] K14-Cre 및 Osr2Ires-Cre transgenic mouse와 교배함으로써 transactivator mouse인 *K14-Cre:Smad4*^{fl/+}와 *Osr2Ires-Cre:Smad4*^{fl/+}를 얻었다. 이들을 다시 *Smad4*^{fl/fl}와 교배하여 Smad4 유전자가 조직특이적으로 적중된 *K14-Cre:Smad4*^{fl/fl}와 *Osr2Ires-Cre:Smad4*^{fl/fl}를 얻고 polymerase chain reaction (PCR)을 통하여 확인하였다.

2. 연구 방법

1) Genotyping PCR

Genomic DNA는 배아에서는 난황주머니(yolk sac), 출생 후에는 꼬리에서 추출하여 PCR을 하였으며 이때 사용된 각각의 oligonucleotide primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 1) [9,10].

2) 신장캡슐이식(kidney capsule transplantation)

E15.5 배아의 하악제1대구치를 현미경하에서 미세분리하고, 분리한 치배는 하루 동안 배양(culture)하면서 genotyping하여 정상치배와 돌연변이의 유전형을 확인하였다. 확인된 정상치배와 돌연변이(*K14-Cre:Smad4*^{fl/fl}, *Osr2Ires-Cre:Smad4*^{fl/fl})치배를 생후 2개월 된 건강한 정상생쥐의 신장캡슐(kidney capsule)에 이식하였고 이 과정은 복강 내에 Ter-amyl alcohol (sigma 240486)과 2,2,2-tribromoethyl alcohol (sigma T4840)을 자입하여 마취한 후 신속하게 수행하였다[11]. 이식 후 2주와 4주째 쥐를 희생시키고 치배를 채취하여 조직학적, 면역화학적 검사를 실시하였다.

Table 1. Sequence of oligonucleotide primer

Gene	Primer	Sequence
Smad4	Smad4b	5'-GGG CAG CGT AGC ATA TAA GA-3'
	Smad4c	5'-GAC CCA AAC GTC ACC TTC AC-3'
K14-Cre	oIMR3069	5'-TTC CTC AGG AGT GTC TTC GC-3'
	oIMR3070	5'-GTC CAT GTC CTT CCT GAA GC-3'
	oIMR0015	5'-CAA ATG TTG CTT GTC TGG TCT-3'
	oIMR0016	5'-GTC AGT CGT GCA CAG TTT-3'
	O Cre1	5'-GTC CCA TTT ACT GAC CGT ACA CC-3'
Osr2Ires-Cre	O Cre1	5'-GTC CCA TTT ACT GAC CGT ACA CC-3'
	O Cre2	5'-GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC ACC-3'

3) 조직학적 염색(H&E stain)

E13.5, E14.5, E15.5 시기의 하악 제1대구치 배아와 신장캡슐 이식 후 2주가 지난 다음 얻은 치배를 4% paraformaldehyde (4% PFA)로 4°C에서 16시간 동안 고정 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명과정을 거쳐 파라핀포매를 하였다. 포매된 조직은 회전식 박절기를 이용하여 5 μm 두께로 연속절편을 만들고 슬라이드에 부착시켜 이후 H&E 염색을 실시하고 광학현미경으로 관찰하였다,

4) 면역조직화학적 검사(immunohistochemistry, IHC)

면역조직화학 염색은 histostain-plus kit (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA)를 사용한 labeled streptavidin-biotin 방법으로 실시하였다. 태아 및 신장은 성체에서 분리한 즉시 4% PFA로 4°C에서 16시간 동안 고정하고, genotyping을 통하여 확인된 조직은 1X PBS로 수세한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 회전식 박절기를 이용하여 5 μm 두께의 연속 절편을 만들고 슬라이드에 부착시켜 건조시킨다. 건조된 슬라이드 조직은 60°C 배양기에서 10~15분간 녹인 후 Xylene I, II를 거쳐 파라핀을 완전히 제거하고 에탄올과 증류수를 거쳐 함수시키고 다시 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 5분간 수세하였다. 수세한 조직절편은 내인성 peroxidase의 활성을 감소시키기 위하여 3% H₂O₂가 함유된 에탄올로 15~20분간 반응시키고 1% bovine serum albumin이 함유된 PBS/BSA로 2회 수세한 다음 비특이적 면역반응을 억제하기 위하여 10% normal goat serum이 함유된 PBS와 30분간 반응시켰다. 조직절편은 primary antibody가 건조되지 않도록 습윤실에 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 조직절편은 실온에서 30분간 추가로 반응시키고 PBS/BSA로 5분씩 2~3회 수세한 다음 biotinylated secondary antibody에 실온에서 30분간 반응시켰다. 조직절편은 다시 PBS로 5분씩 2~3회 수세하고 0.003% H₂O₂가 포함된 0.03% 3,3'-diaminobenzidine tetrahy-

drochloride에서 5~10분간 발색하였다. 발색이 끝난 조직절편은 증류수로 수세한 후 Mayer's Hematoxylin을 이용해서 대조염색하고 탈수 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 실험에 사용한 antibody로는 Smad4, Osterix, Amelogenin, alkaline phosphatase (ALPL)를 사용하였다.

결 과

본 연구에서는 TGF-β/BMP superfamily의 key mediator인 Smad4를 상피(K14-Cre:Smad4^{fl/fl})와 간엽(Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl})에서 조직특이적으로 유전자 적중환 생쥐를 이용하여 치아 발생 중 표현형, 면역조직화학적 분석, 신장캡슐이식 등을 통해 관찰한 후 치아 발생 중 TGF-β/BMP superfamily signaling의 역할과 상피-간엽의 상호 신호전달 과정을 알아보았다.

1. 표현형

K14-Cre:Smad4^{fl/fl} 생쥐는 생후 1일째(P0)에 사망하며 수염이 없었고 열린 눈꺼풀, 크기가 작은 표현형을 보이고 있었다. 사망원인은 위에 내용물이 없는 것으로 보아 음식물 섭취를 하지 못해 사망한 것으로 판단된다. 또한 Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl} 생쥐도 같은 시기인 P0에 사망하며, 열린 눈꺼풀, 구개열, 크기가 작고 구부러진 발 등의 표현형을 보이고 있었다. 사망의 원인으로 구개열로 인해 음식물 섭취를 하지 못하여 사망한 것으로 생각된다(Fig. 1).

2. 배아기치배의 조직학적 분석

초기치아발생과정을 비교해 보기 위해서 E13.5, E14.5, E15.5 일 각각의 시기의 하악구치배아를 H&E 염색으로 관찰한 결과 K14-Cre:Smad4^{fl/fl}와 Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}의 모두에서 치배형성은 정상대조군(wild type)과 큰 차이 없이 정상적으로 이루어지는 것으로 생각된다(Fig. 2A~2I).

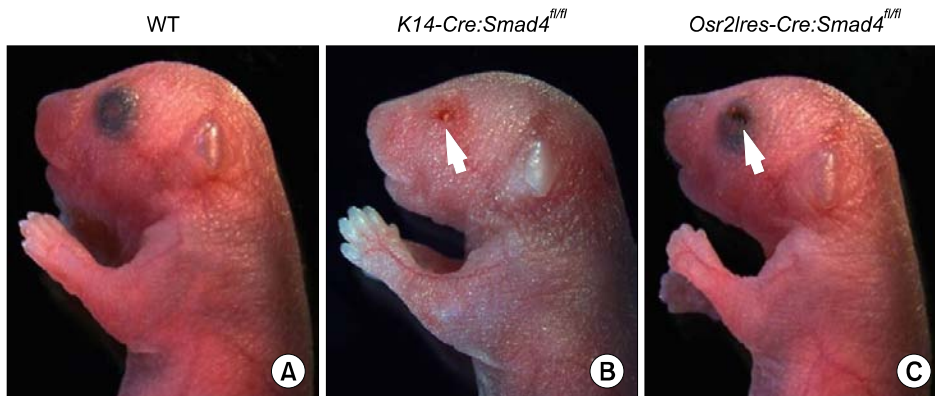


Fig. 1. (A, B, C) Phenotype. Postnatal 0 stage stereo microscope analysis of wild type (Smad4^{fl/fl}), K14-Cre:Smad4^{fl/fl}, Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl} by extension in the flesh. (B) K14-Cre:Smad4^{fl/fl} shows open eyelid, small size, no whisker, die within a day after birth. (C) Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl} shows open eyelid, cleft palate, curved limb, small size, and die within a day after birth. WT, wild type.

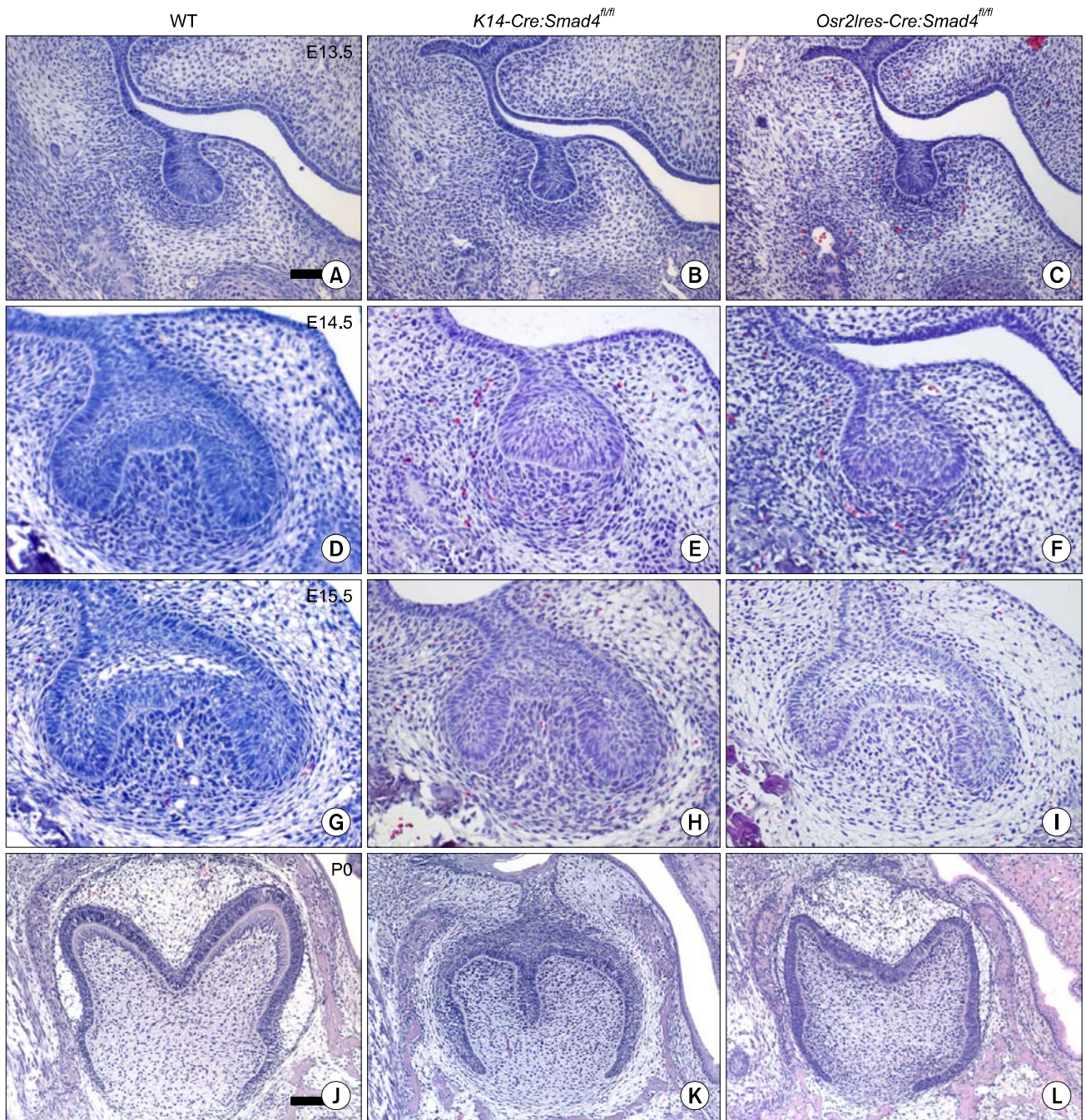


Fig. 2. Normal tooth development in bud and cap stage of mutant embryos. H&E staining of lower molar tooth germ in the (A~C) bud stage, (D~I) cap stage, and (J~L) late bell stage. No defect or delay in development from the bud to cap stage was detectable in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* and *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*. Wild type (WT, *Smad4^{fl/fl}*). Scale bars: 50 μ m in (A~I), 100 μ m in (J~L).

3. 생후 1일째(P0) 조직학적 분석

정상생쥐의 P0 치배는 후기종시기(late Bell stage)로 치아관(dental lamina)이 소실되어 있고 상피세포는 법랑모세포로 분화되며 치성간엽세포는 상아모세포로 분화되면서 정상적으로 법랑질과 상아질을 만들어내고 있었다(Fig. 3A, 3D).

1) *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* 생쥐의 치배는 정상대조군에 비하여

치배의 크기가 작고, 치아관은 소실되지 않고 유지되고 있었으며 상피세포의 분화가 이루어지지 않아서 별그물조직세포(stellate reticulum cells)나 중간층(stratum intermedium)이 존재하지 않았고 내치아상피(inner enamel epithelium)는 형성되어 있으나 법랑모세포로 분화하고 있지 않았다. 또 치아유두(dental papilla)에서 치성간엽세포들 또한 상아모세포로 분화되지 못하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 치배의 전반적인 형태는 매우 불규칙

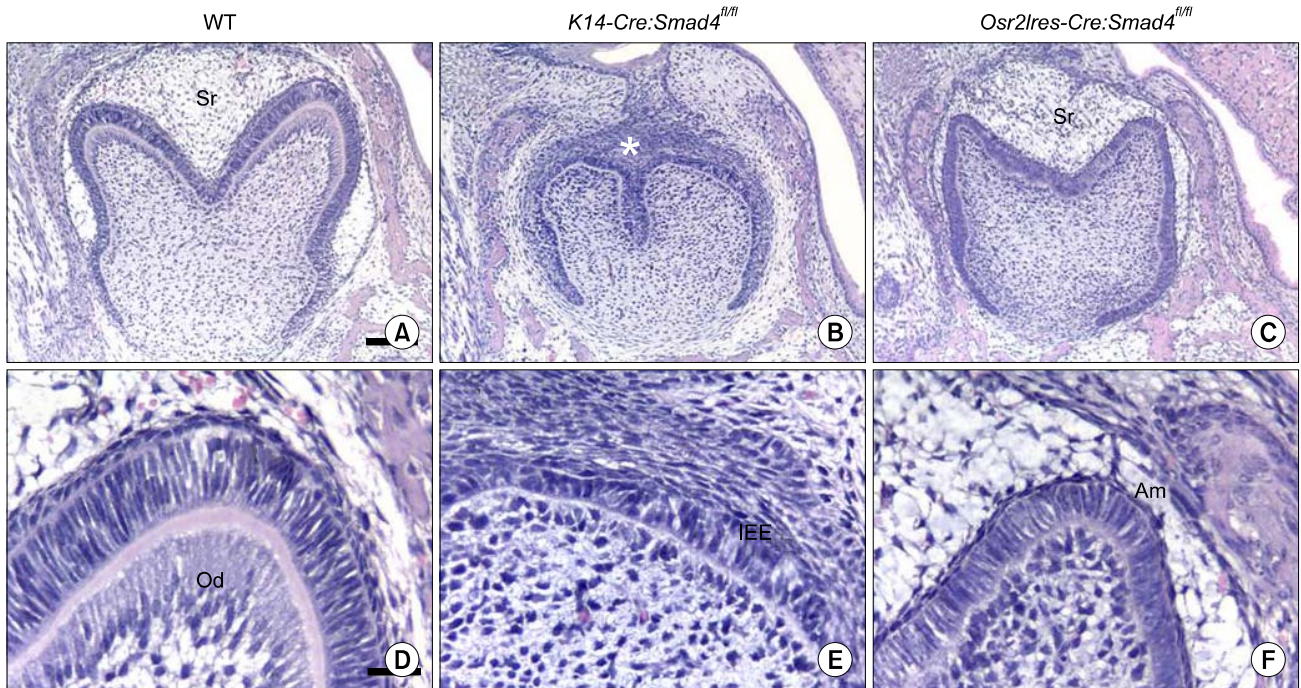


Fig. 3. Alteration in tooth morphogenesis of newborn (P0) in mutants. (A~F) Microscope analysis of wild type, *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* lower molar tooth germs by H&E stain. (B, E) Inner enamel epithelium were detectable in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, however ameloblast, odontoblast and stellate reticulum were not detectable. (C, F) Ameloblasts were normally differentiated from IEE in *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*. Asterisk(*) in panel B shows no Sr differentiation in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* enamel organ. WT, wild type; Sr, stellate reticulum; Od, odontoblast; IEE, inner enamel epithelium; Am, ameloblast. Scale bars: 100 μm in (A~C), 25 μm in (D~F).

적이지만 정상군과 비슷한 종시기로 보이나 상피세포나 치성간엽 세포들의 성장, 분화 정도를 볼 때는 초기단계의 종시기 정도로 정상군에 비해 늦어지고 있다. 또한 치아의 형태형성 시에 신호전달의 중심역할을 하는 법랑질결절(enamel knot)의 형태도 정상군과는 매우 다른 모습을 보이고 있어서 치관의 형태형성과 성장을 조절하는 신호중심으로서 역할을 정상적으로 하고 있지 못하는 것으로 보인다(Fig. 3B, 3E).

2) *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* 생쥐의 전체적인 치배의 크기는 정상에 비해 작았으나 치아관이 정상적으로 소실되어 있고 상피세포들의 분화도 비교적 정상적으로 되는 모습으로 별그물조직세포나 중간층이 존재하고 법랑모세포가 분화되는 것도 관찰할 수 있다. 치아의 형태는 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*에 비하여 정상과 비슷하게 치관의 유형을 형성하고는 있으나 정상에 비해서 늦어지는 모습이고 법랑모세포도 덜 성숙된 것으로 보인다. 그리고 치아 유두에서 치성간엽세포들은 상아모세포로 분화하고 있지 못하였다(Fig. 3C, 3F).

4. 생후 1일째 치배의 면역조직화학적 분석

P0 생쥐의 제1대구치배에서 볼 수 있는 법랑모세포나 상아모세포 등의 표식자들을 이용하여 면역조직화화염색을 해서 이들의 발현 양상을 관찰하였다. 사용된 antibody는 *Osterix*, *Smad4*, *Amelogenin*, *ALPL*이다. *Smad4*는 치배의 법랑모세포와 상아모

세포에서 발현하는 인자로서 정상대조군에서는 모두 발현하였으나 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*에서는 발현을 전혀 찾아볼 수 없었고, *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*는 부분적으로 법랑모세포에 발현하고 있었다. *Osterix*는 분화중인 상아모세포에서 발현하는 인자이고 정상대조군에서는 상아모세포에 정상적으로 발현하는 것을 확인하였으나, *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*에서는 발현하지 않았다. 그리고 *Amelogenin*은 성숙된 법랑모세포에 발현하는 표식자로 정상대조군은 법랑질 결절이 있는 교두쪽의 성숙된 법랑모세포에서 발현하는 것을 관찰하였지만 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*에서는 발현을 관찰할 수 없었다. 그리고 *ALPL*은 상피기원인 별그물조직이나 중간층세포와 치아유두쪽에 발현한다. 정상대조군에서는 정상적으로 발현하는 반면 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* 상피세포에 부분적으로 발현하고, *Osr2ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*에서는 중간층세포에서 강하게 발현하는 것을 볼 수 있다(Fig. 4).

5. 신장캡슐이식 후 치아형태 및 조직소견

E15.5일 된 배아의 하악제1대구치를 채취하여 하루 동안 배양 하면서 genotyping한 다음 정상생쥐의 신장캡슐에 이식하고 각각 2주와 4주 후에 관찰하였다. 2주 후의 치배는 H&E 염색, 4주 후의 치배는 치아의 형태형성을 관찰하기 위해서 치아를 직접 분리하여 현미경 관찰하였다. 정상군에서 신장캡슐이식 2주째는

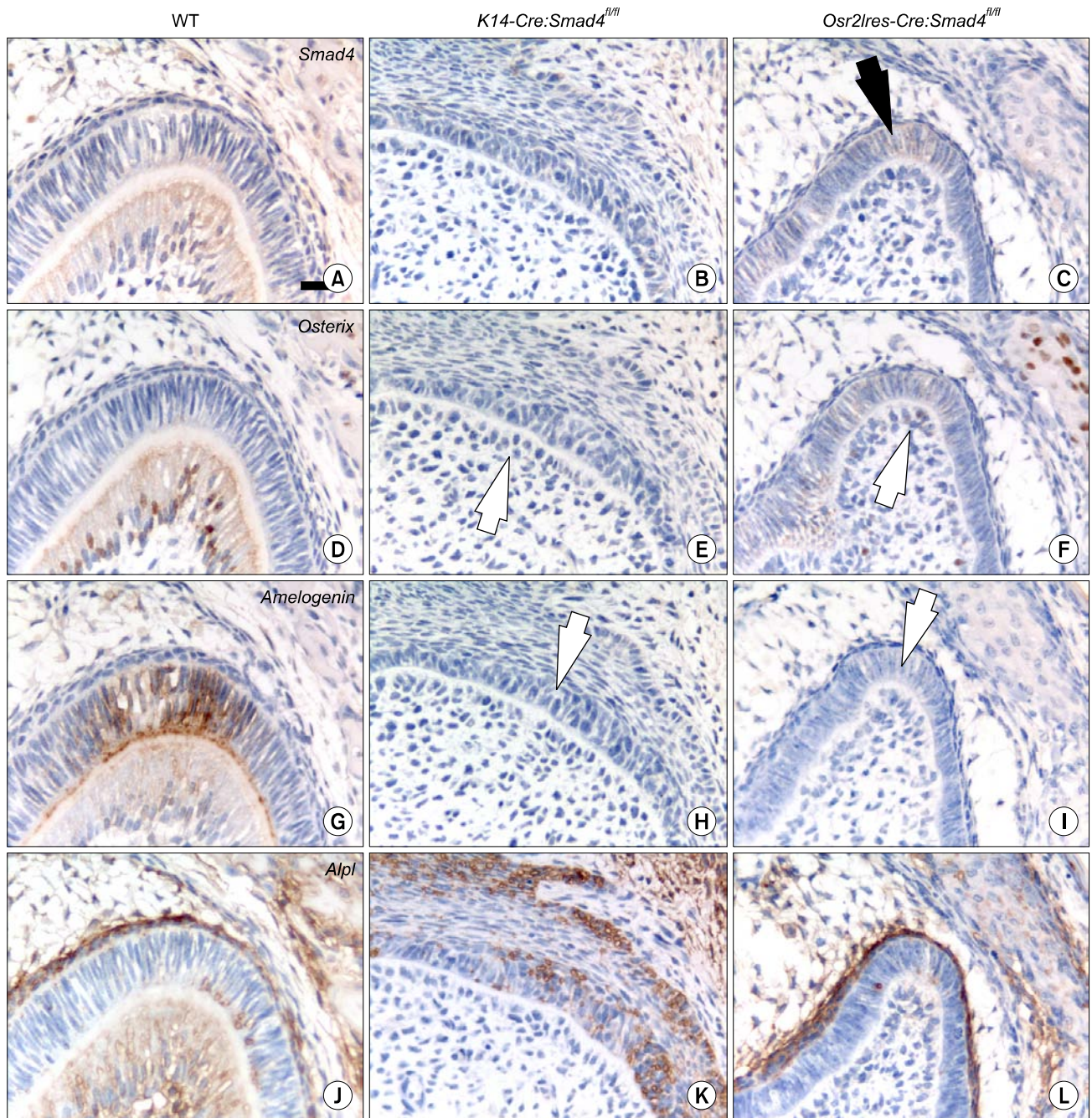


Fig. 4. Immunohistochemistry analysis of newborn in mutants. Immunohistochemistry for (A~C) *Smad4*, (D~F) *Osterix*, (G~I) *Amelogenin*, (J~L) *Alpl* in wild type, *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* and *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* lower molar tooth germs at P0. Black arrow in panel C indicates *Smad4* expression in ameloblasts of *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*. Expression of *Osterix* in mesenchymal cells (white arrow in panel E, F) is not detectable in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*, as well as *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*. Expression of *Amelogenin* are not detectable in inner enamel epithelium (IEE) of *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* (white arrow in panel H) and ameloblasts of *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}* (white arrow in panel I). Scale bar: 25 μ m in (A~L). WT, wild type.

법랑질과 상아질이 정상적으로 침착되고 있는 것을 볼 수 있고 4주째에는 정상적으로 형성된 치관형태를 볼 수 있다(Fig. 5A, 5D).

1) **신장캡슐이식 후 2주째 조직소견(E15.5+1+2주)-H&E 염색**

*K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*의 경우 상피세포들이 분화되지 못하고 원시상태를 그대로 유지하고 있었으며 따라서 법랑모세포도 관찰할 수 없고 그 결과 법랑질도 형성되지 않았다. 또한 치아유두의

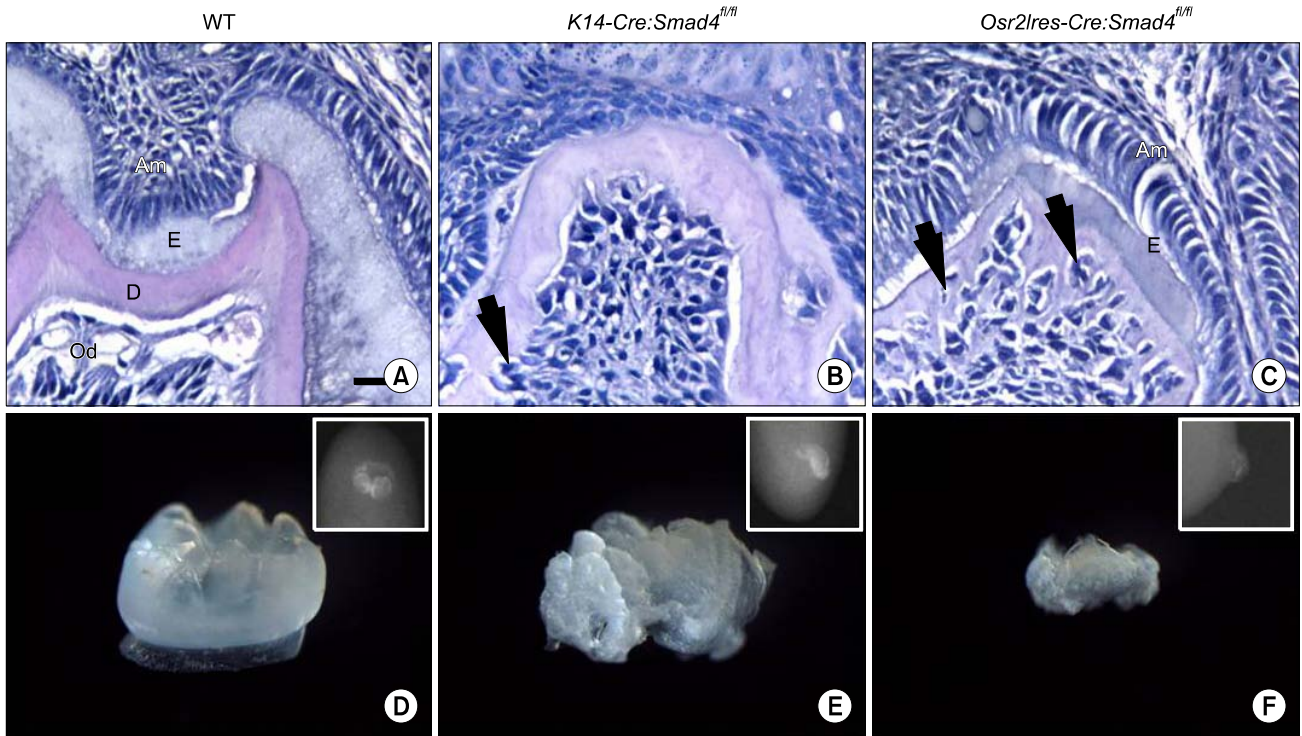


Fig. 5. Analysis after kidney capsule transplantation in mutants. (A~C) H&E staining analysis of wild and mutants after 2 weeks kidney capsule transplantation of lower molar tooth germ at P0. (D~F) Macroscopic view of wild and mutants after 4 weeks kidney capsule transplantation of molar tooth germ at P0. (B) Histologically, incomplete dentin-like structures were formed in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*. (E) Macroscopically, multiple and irregular hard tissues were seen in *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*. (C, F) Bone-like structures with cellular inclusion were formed in dentin region of *Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*. Black arrows in panel B, C indicate cellular inclusion. WT, wild type; Am, ameloblast; Od, Odontoblast; D, dentin; E, enamel. Scale bar: 25 μ m in (A~C).

치성간엽조직에서는 상아질과 유사한 경조직이 형성되고는 있으나 정상적인 치관 형태와는 매우 다른 모습을 보이고 있다. 경조직 하방의 세포들도 상아모세포는 보이지 않았고 부분적으로는 cellular inclusion을 보이는 골조직과 유사한 형태로 나타나는 곳도 있었다(Fig. 5B).

*Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*인 경우 정상대조군보다 느리기는 하나 정상적으로 법랑모세포가 존재하고 법랑질도 형성되고 있었다. 특이하게도 치성간엽조직에는 경조직이 형성되고는 있으나 상아모세포는 보이지 않고 cellular inclusion이 골조직과 거의 유사하게 형성되어 있는 것으로 보아 치성간엽조직세포들은 odontogenic potential을 잃어버리고 상아질이 아닌 골성경조직 또는 osteodentin으로 최종 분화된 것으로 생각된다(Fig. 5C).

2) 신장캡슐이식 후 4주째 소견(E15.5+1+4주)

*K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*의 경우 치아의 모양이 정상대조군과는 다른 것을 알 수 있다. 신장캡슐이식 2주째 H&E 염색에서 보여지듯이 법랑질은 형성이 안 되어 있는 상태이고 상아질과 유사한 경조직으로만 형성되어 있으면서 표면이 매끄럽지 못하고 울퉁불퉁하며 치관의 형태를 제대로 갖추지 못하고 있었다(Fig. 5E).

*Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*인 경우는 정상대조군보다 매우 작았

다. 그리고 법랑질의 표면도 거칠었으나 형태적인 면에서는 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*보다 치아에 가까운 모양을 가지고 있었다 (Fig. 5F).

고 찰

초기치아 형성의 시작은 제1인두궁에 있는 구강상피가 외배엽성 중간엽 쪽으로 두꺼워지면서 시작하여 싹시기(bud stage), 모자시기(cap stage), 종시기(bell stage)를 거치며 법랑질결절(enamel knot), 치아목고리(cervical loop)를 형성한다. 후기종시기의 과정에서는 치관, 치근을 형성하는데 이 시기에는 상피세포가 법랑모세포로 분화되면서, 법랑질 기질단백질을 분비하고 상피세포와 인접한 외배엽성 중간엽세포는 상아모세포로 분화되어 상아질 기질단백질을 분비하게 된다. 이렇게 형성된 단백질들은 광화과정을 통해서 법랑질과 상아질을 형성하여 치아를 구성하게 된다. 이와 같은 과정을 거치면서 치아를 형성하고, 여기에는 많은 전사인자 및 성장인자, 분비단백질이 관여하여 치아 발생이 이루어진다[12]. 이와 같이 초기치아 발생에서 치아형성잠재능(odontogenic potential)이 상피로부터 시작되고 이후 상피와 간엽의 상호작용을 통하여 신호전달이 이루어진다. 치아 발생과

형태형성에서 잘 알려진 전사인자로는 *Pitx2*, *p21*, *Msx1*, *Msx2*, *Lef1*, *Brax1*, *Dix1*, *Gli1*, *Gli2*, *Runx2*, *Pax9*, *Lhx6*, *Lhx7* 등이 있고, 성장인자로는 *TGF-β*, *BMP*, *FGF*, *SHH*, *WNT*, *TNF*, *ACTIVIN* 등이 관여를 하는 것으로 알려져 있으며 이들은 상피와 간엽의 상호작용을 통하여 치아발생과 형태형성에 있어 매우 중요시된다[13,14].

치성간엽조직에서 상아질형성 시에는 *TGF-β* superfamily, IGFs, WNTs 그리고 FGFs member들이 기여하고 있는 것으로 보고되고 있다[15-17]. 특히 *TGF-β*/*BMP* superfamily는 초기 치아 발생 시 상피와 간엽에서 중요한 역할을 하고 있고 치아의 형성, 유형, 세포의 증식, 세포의 이주, 세포사멸 등과 밀접한 관계를 갖는다고 알려져 있는데 이 신호전달에서 Smad4가 key mediator로 역할하고 있다. Smad4가 치아 발생 시 신경능세포(neural crest cells)에 미치는 역할에 관한 연구는 최근에 조직특이적인 유전자적중 기술이 발전되면서 연구되기 시작하였는데 신경능세포에서 Smad4를 선택적으로 제거한 실험연구에서 치아의 초기 발생 시 Smad4가 결정적인 역할을 하고 있는 것이 밝혀진 바 있다[11]. 본 연구에서는 조직/시간 특이적인 유전자 제거기술을 이용하여 초기 발생 이후 즉, 모자시기 이후에 상피와 간엽에서 Smad4의 역할에 관하여 관찰하였다.

치아발생 중 모자시기부터 법랑기관에서 별그물조직, 외치아상피, 내치아상피, 중간층이 나타나고 이들이 법랑기관의 형태와 성장에 관여하게 된다. 또한 법랑질결절이 나타나기 시작하는데 여기에서 전해지는 신호에 의해서 치관의 형태와 크기가 정해지게 된다[18]. 종시기가 시작되면 내치아상피는 풋법랑모세포(preameloblast)로 분화되면서 핵의 재극성이 이루어지고 이들이 치아유두세포의 분화를 유도하며 스스로는 법랑비탕질을 분비하는 법랑모세포로 분화된다. 치아유두에서는 치성간엽조직세포들이 상아모세포로 분화되기 시작하는데 이 세포들도 핵의 위치가 바닥막에서 먼쪽으로 이동하는 재극성과정을 거치게 되고 풋상아질(predentin)을 바닥막쪽으로 분비하기 시작한다. 풋상아질이 형성되면서 풋법랑모세포와 상아모세포 사이의 바닥막이 붕괴되고 이때 풋법랑모세포가 풋상아질의 유도에 의해 법랑모세포로 분화되면서 법랑질형성이 시작된다. 이후에 법랑비탕질이 풋상아질에 닿으면 붕괴된 바닥막에 광화가 일어나 상아법랑경계를 만든다.

본 연구에서는 상피세포에서 Smad4를 제거시켰을 경우(*K14-Cre:Smad4^{fl/fl}*) 내치아상피가 법랑모세포로 분화가 안 되고 있는 것이 확인되었는데 이는 Smad4가 상피세포의 분화에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 의미한다. 또한 치아유두에서는 외배엽성 중간엽 세포들이 상아모세포로 분화되지 않는 것을 조직학적 소견과 조직면역화학 염색에서(*osterix*, *amelogenin*) 확인할 수 있었다. 그 이유는 조직학적(P0, H&E stain) 소견상 치배의 크기가 정상대조군에 비해 작은 것으로 보아서 성장과 발생의 지연에서 생기는 것으로 추측할 수도 있고, 또는 내치아상피가 법랑모세

포로 분화되지 못함으로써 그 영향을 받아 외배엽성 중간엽세포들이 상아모세포로의 분화가 안 되는 것으로 추측할 수도 있는데 생후 1일째의 조직학적 소견만 가지고는 확인이 불가능하다. 좀 더 확실한 증거를 찾기 위해 생후 1일째 이후의 발생과정을 관찰하는 것이 필요하게 되었는데 *K14-Cre:Smad4^{fl/fl}* 생쥐는 태어난 첫날 사망하기 때문에 그 이전의 배아기치배를 정상생쥐의 신장캡슐에 이식하여 관찰하였다. 그 결과, 상피에서는 여전히 내치아상피단계를 못 벗어난 상태, 즉 법랑모세포뿐 아니라 법랑질형성도 전혀 되지 않고 있었다. 그러나 울퉁불퉁한 모습을 띄고 있는 경조직을 관찰할 수 있었는데 이는 정상치관과는 많이 다른 형태였으며 조직소견상 이들은 상아질과 매우 유사한 모습으로 치아유두의 치성간엽조직에서 유래된 것이었다. 이러한 실험결과로 보아 상피에서 smad4를 제거하였을 때, 내치아상피가 법랑모세포로 분화가 안 되는 것이 치성간엽조직세포의 odontogenic potential에 영향을 주고 있는 것을 알 수 있다. 그러나 상아질과 유사한 경조직이 형성되는 것으로 보아서 간엽세포들이 상아모세포로 분화되는 것이 상피의 법랑모세포에 의해 전적으로 의존하는 것은 아닌 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 “상아질을 분비하기 위한 상아모세포분화는 내치아상피에 의해서 조절되고 있다”는 지금까지의 연구보고[19-22]와는 다른 결과로 상아질 형성단계에서 상피와 간엽세포들의 신호전달기전을 밝히기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

또한 치성간엽조직에서 Smad4를 제거한(*Osr2Ires-Cre:Smad4^{fl/fl}*) 경우에는 조직학적(H&E stain), 면역조직화학적 염색(*amelogenin*) 결과로 보아 정상군보다 속도가 느리기는 하나 정상적으로 법랑모세포가 존재하고 법랑질도 형성되고 있었다. 그러나 치성간엽조직에는 상아모세포분화도 안되고 상아질도 형성되지 않았는데 신장캡슐이식 후 조직소견에서는 cellular inclusion 등을 보이는 골성경조직이 형성되고 있었다. 즉 치성간엽세포에서 smad4를 제거한 경우에는 치아유두에 있는 치성간엽조직세포의 odontogenic potential이 사라지면서 세포들이 osteogenic potential로 전환되는 것으로 추측된다. 종합해서 볼 때 Smad4는 상아질형성 기간 동안 상아모세포의 분화에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 법랑모세포의 분화, 법랑질기질단백질의 분비와 법랑질의 형성은 상아모세포에 의해서 조절되는 것은 아니고 독립적으로 이루어지고 있는 것으로 보인다. 이 연구결과도 지금까지 “법랑모세포의 분화는 풋상아질을 분비하고 있는 상아모세포에 의해서 조절된다”고 하는 보고들[23,24]과는 다른 결과로 이 시기에 상피-간엽이 상호작용하면서 교환되는 신호전달물질을 밝히는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 연구를 통해서 얻은 결론은 다음과 같다.

1) TGF- β /BMP signaling을 조절하는 데 중심역할을 하는 Smad4는 치아형성과정 중 상피세포와 치성간엽세포가 각각 법랑모세포와 상아모세포로 분화하는 데 핵심적인 기능을 하고 있다.

2) 치아형성 중 치성간엽세포가 상아모세포로 분화되는 과정은 상피의 법랑모세포에 의해서 조절이 되고는 있으나 전적으로 의존하고 있지는 않은 것으로 생각된다.

3) 법랑모세포의 분화, 법랑질기질단백질의 분비는 치성간엽에서 분화하고 있는 상아모세포에 의해 직접적인 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

본 연구결과는 치아형성 중 특히 법랑모세포나 상아모세포의 분화과정 중에 상피-간엽 사이에서 교환되는 신호전달물질들을 찾아내고 상피-간엽 간 신호전달기전을 밝히는 데 새로운 기초자료로서 사용될 수 있을 것이다.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No. 2008-2-E00558 and 2011-0027790).

References

- Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987;32:123-7.
- Peters H, Neübuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998;12:2735-47.
- Wall NA, Hogan BL. TGF-beta related genes in development. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:517-22.
- Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-46.
- Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.
- Yang X, Li C, Xu X, Deng C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3667-72.
- Kwan KM. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 2002;32:49-62.
- Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002;32:80-1.
- Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001;24:71-80.
- Lan Y, Jiang R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth. *Development* 2009;136:1387-96.
- Ko SO, Chung IH, Xu X, *et al*. Smad4 is required to regulate the fate of cranial neural crest cells. *Dev Biol* 2007;312:435-47.
- Xu X, Jeong L, Han J, Ito Y, Bringas P Jr, Chai Y. Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol* 2003;47:31-9.
- Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;116:1647-8.
- Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 2002;217:93-135.
- Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-20.
- Fjeld K, Kettunen P, Furmanek T, Kvinnsland IH, Luukko K. Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth. *Dev Dyn* 2005;233:161-6.
- Suomalainen M, Thesleff I. Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/beta-catenin signaling in the epithelial stem cells. *Dev Dyn* 2010;239:364-72.
- Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:19-29.
- Cam Y, Neumann MR, Oliver L, Raulais D, Janet T, Ruch JV. Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors during mouse odontogenesis. *Int J Dev Biol* 1992;36:381-9.
- Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51-68.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867-9.
- Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001;15:14-8.
- Karcher-Djuric V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV. Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* 1985;29:169-75.
- Ruch JV. Determinisms of odontogenesis. *Revis Biol Celular* 1987;14:1-99.