

2010년 2월

박사학위논문

백악모세포가 범랑모세포의 세포사멸에 미치는 영향

김성일

2010년 2월
박사학위논문

백악모세포가 범랑모세포의 세포사멸에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 성 일

백악모세포가 법랑모세포의
세포사멸에 미치는 영향

Effects of cementoblasts on the apoptosis of
ameloblasts *in vitro*

2010년 2월 일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 성 일

백악모세포가 법랑모세포의
세포사멸에 미치는 영향

지도교수 김 홍 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 성 일

김성일의 박사학위 논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교수 김 병 옥 인

위 원 조선대학교 교수 김 수 관 인

위 원 전남대학교 교수 김 선 현 인

위 원 서울대학교 교수 박 주 철 인

위 원 조선대학교 교수 김 흥 중 인

2009년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
III. 결과	7
IV. 고찰	10
V. 참고문헌	15
사진부도설명	20
사진부도	22

도 목 차

- Fig. 1. Effect of OCCM-CM on the proliferation of ALCs and KB cells and the apoptosis of ALCS. 22
- Fig. 2. Comet assay for the detection of apoptosis in single cell. 22
- Fig. 3. TUNEL assay for the detection of apoptosis in control and co-cultured ALCs. 23
- Fig. 4. Expression of Fas and FasL mRNA and proteins in control and co-cultured ALCs analyzed by RT-PCR and western blot. 23
- Fig. 5. The apoptosis was analysed by Comet and TUNEL after the treatment of Fas antagonist, Kp7-6, during co-culture. 24

ABSTRACT

Effects of cementoblasts on the apoptosis of
ameloblasts *in vitro*

Kim, Sungil

Advisor: Kim, Heung-Joong, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Biomedical Engineering,

Graduate School of Chosun University

Tooth development is complex processes in which epithelial-mesenchymal interactions play pivotal roles in controlling tooth and periodontium formation. After crown formation, Hertwig's epithelial root sheath (HERS) is formed from ectodermally-derived internal and external enamel epithelium, and play important roles in root dentin formation and cementogenesis. HERS cells eventually dissociates from the root surface to form the epithelial rests of Malassez (ERM), and some of them undergo apoptosis. HERS breaks up into epithelial cords at the very beginning of cementogenesis. However, it is not clear yet whether HERS cells simply undergo apoptosis or whether other mechanisms contribute to their reduction and apoptosis. Our hypothesis is that developing cementoblasts can affect the cellular changes of HERS cells including apoptosis during root formation.

HERS cells are derived from ameloblast lineage cells. To identify the role of cementoblasts in HERS cell apoptosis, we evaluated the effects of

cementoblasts on the apoptosis of ameloblasts using co-culture system between cementoblastic OCCM-30 and ameloblastic ALCs. A transwell co-culture system, comet assay, TUNEL staining, and DNA fragmentation assay were used to detect the interplay between ameloblasts and cementoblasts as well as the apoptosis of ameloblasts. The expression of apoptosis related genes was evaluated by RT-PCR and western blot analysis.

Cementoblasts increased genomic DNA fragmentation of ameloblasts in our co-culture system. TUNEL and comet assay showed more apoptotic cells in co-cultured ameloblasts with cementoblasts than normal ameloblasts. However, cementoblasts couldn't facilitate the apoptosis of oral epithelial cells (KB) as seen in ameloblasts. During the co-culture, Fas expression was increased in co-cultured ameloblasts compare with the normal ameloblasts while FasL expression was increased in cementoblasts after co-culture. Treatment of Kp7-6, Fas antagonist, showed reduction of apoptosis in co-cultured ameloblasts. These data suggest that cementoblast facilitates the apoptosis of HERS cells and this apoptosis might be related to Fas-FasL pathway during root formation.

Keywords: HERS, apoptosis, cementoblast, ameloblast, root formation

I. 서 론

치아의 발생은 동적이며 매우 복잡한 과정으로 치성상피와 외배엽성 간엽 세포 사이의 상피-간엽상호작용(epithelial-mesenchymal interactions)이 치아와 치주조직형성을 조절하는 중추적인 역할을 한다.

치관이 형성된 후 Herwig 상피치근집(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)이라 불리는 두층의 상피구조가 치근단쪽으로 내려와서 치근형성을 시작한다. 이 두층의 상피세포는 외배엽 기원의 외측(external enamel epithelium)과 내측 법랑상피(internal enamel epithelium)로 이루어져 있다(Thomas, 1995). 형태학적으로 HERS는 두개의 치성 외배엽성간엽조직(ectomesenchyme) 즉 치유두(dental papilla)와 치낭(dental follicle)의 사이에 존재한다. HERS 세포는 궁극적으로 치주인대내로 이동하여 Malassez 상피세포 잔사(Epithelial rests of Malassez, ERM)로 남게 되고(Wentz 등, 1950; Rincon 등, 2005), 그 과정에서 일부의 세포는 사멸(apoptosis)되는 것으로 알려져 있다(Kaneko 등, 1999; Cerri 등, 2000; Cerri와 Katchburian, 2005). 그러나 아직까지 HERS 세포의 사멸과정 또는 이를 조절하는 인자들에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

백악질은 주위 이틀뼈와 함께 치주인대가 부착되어 있으며 치아지지에 중요한 조직이다. 그러나 백악질을 형성하는 백악모세포의 기원과 분화과정에 관하여는 아직까지도 많은 논란이 있다. 최근의 연구들을 종합해보면 백악질 형성에 관하여는 크게 두 가지 이론이 있다. 첫째는 치낭의 외배엽성간엽세포가 붕괴된 HERS 사이로 들어와 백악모세포로 분화하여 풋상아질과 접촉하고 치근표면에 백악질을 형성하기 시작 한다는 것이다(Cho와 Garant, 1988; 2000). 두 번째는 HERS가 상피-간엽 형질전환과정을 통해 직접 백악모세포로 분화하여 백악질을 형성 한다는 것이다(Foster 등, 2007; Sonoyama 등, 2007).

HERS가 백악질 형성을 포함하는 치근형성과정에서 적어도 두 가지 기능

을 하는 것은 분명하다. 첫째는 법랑모세포 기원의 두층의 세포로 구성된 HERS가 치관에서의 기능과 유사하게 치근 상아모세포의 분화를 유도한다는 것이다(Diekwisch, 2001). 두 번째는 HERS가 치낭세포로부터 백악모세포의 분화를 유도하거나 직접 백악모세포로 분화하는 등의 백악질을 포함하는 치근의 조직화에 관여한다는 것이다(Owens, 1978; Diekwisch, 2001). 따라서 백악질의 형성과정을 명확히 이해하기 위해서는 백악모세포가 분화하는 시점에서 HERS의 세포 변화와 세포의 운명을 명확히 관찰하는 것이 필요하다.

치근 형성과정을 형태학적으로 관찰해보면 상아모세포가 풋상아질을 형성한 직후 HERS가 붕괴되어 구멍이 나면 치낭으로부터 외배엽성간엽세포가 구멍이 난 사이로 들어와 풋상아질과 접촉하고 치근표면에 백악질을 형성하기 시작 한다. 두층의 HERS가 붕괴될 때 HERS 세포들은 입방형 모양에서 납작한 형태로 바뀌면서 치낭쪽인 바깥쪽의 바닥막(basement membrane)이 파괴되고 뒤이어 안쪽 바닥막이 파괴 된다(Andujar 등, 1984; 1985). 이 과정에서 중요한 사실은 백악질 형성이 시작되는 바로 그 시점에 HERS의 세포들이 서로 붕괴되고 서로 떨어지게 되어 치낭의 외배엽성 간엽세포들이 상아질외면으로 들어 올 수 있게 된다는 것이다(Diekwisch, 2001; 2002). 이 현상은 사람과 생쥐 그리고 모든 포유동물의 치아 발생과정에서 관찰된다. 이 연구 결과들은 치낭세포, 분화과정의 백악모세포와 백악세포가 HERS의 세포 변화에 영향을 끼칠 수 있음을 시사한다.

이 연구에서는 백악모세포(OCCM-30)가 법랑모세포(ALCs)의 세포사멸에 미치는 영향을 평가하여 법랑모세포기원의 세포들로 이루어진 HERS의 세포사멸에서 백악모세포의 역할을 구명하고, 이를 토대로 궁극적으로는 백악질의 형성과정에서 HERS의 기능을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주와 세포배양

사람 구강상피세포주로서 KB 세포주(ATCC)와 법랑모세포주로 ameloblast-lineage cells (ALCs, Nakata 등, 2003) 그리고 백악모세포주로 불멸화된 murine cementoblast인 OCCM-30 세포(D'Errico 등, 2000)를 주 배양세포로 사용하였다. OCCM-30 세포는 10 mM HEPES (pH 7.2, Sigma Chemical Co.)와 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Co.) 그리고 100 IU/ml Penicillin - 100 μ g/ml Streptomycin (Invitrogen Co.)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL)에 배양하였다. ALCs와 KB 세포주는 minimum essential medium (MEM) 배지에 5% FBS와 epithelial growth factor (EGF, 50 ng/ml, R&D systems)를 첨가한 후 type I collagen 이 coating된 배양접시에서 배양하였다.

2. 조건배지의 추출과 co-culture

OCCM-30 세포를 배양하여 각각의 세포가 분비한 물질을 포함하고 있는 배양액(조건배지)을 KB세포와 ALCS의 세포 배양에 이용하였다.

ALCs-OCCM30과 KB-OCCM30의 조합으로 co-culture를 시행하였다. co-culture는 Trans well 세포배양기 (3450-clear, Corning)를 이용하였으며, 법랑모세포주인 ALCs를 배양기의 바닥에 위치시키고 insert에 백악모세포주인 OCCM30을 배양하였다 (Fig. 1A). 세포는 50 μ g/ml ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate 포함된 DMEM 배지에서 1주일간 배양하였다.

3. MTT assay

KB와 ALCS세포의 증식도는 MTT {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole} assay를 이용하여 측정하였다. 24-well 배양기에 well 당 1×10^3 cell의 KB와 ALCS 세포와 insert에 5×10^2 cell의 OCCM-30 세포를 co-culture하였다. co-culture 후 3일, 5일, 그리고 7일 후에 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 세포를 PBS로 세척 후 50 μ l의 MTT를 각 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 DMSO 200 μ l를 첨가한 뒤 540 nm 파장에서 microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

4. Genomic DNA 분리와 DNA fragmentation의 확인

OCCM-30세포와 ALCs세포의 DNA fragmentation을 비교하기 위하여 두 세포에서 genomic DNA를 분리하였다. 두 세포의 co-culture 3, 5, 및 7 일 후에 세포들을 1× PBS로 세척하고 labopass genomic DNA ISOLATION KIT (Cosmogenetech, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 각 각의 genomic DNA를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 DNA fragmentation을 확인하였다.

5. Comet assay

개별 세포들의 세포사멸을 확인하기 위하여 comet assay를 시행하였다. 일정 기간 co-culture후 세포들을 0.05% trypsin을 이용하여 세포배양기에서 떼어낸 후 1% agarose가 coating된 slide에 위치시키고 4°C에서 4시간 동안 방치하였다. 그 후 slide를 alkaline buffer내에서 전기영동 한 후 etidium bromide로 염색하여 형광형미경으로 관찰하였다. 결과의 분석은 Cometscore 15 program을 이용하여 시행하였다.

6. TUNEL POD staining

일정기간 co-culture한 OCCM-30과 ALCs 세포들을 coverslip 위에서 PBS로 세척하고 4% paraformaldehyde로 4°C에서 4시간 고정 한 후 다시 PBS로 세척하고 실온에서 30분 방치하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 염색 전에 2% H₂O₂ 용액으로 처리하였다. 염색은 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) kit (In Situ Cell Death Detection Kit, POD)를 이용하여 제조회사(Roche Molecular Biochemicals)의 지시에 따라 시행하였으며 DAB로 발색하여 관찰 하였다.

7. Total RNA 분리와 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRIzol reagent (Invitrogen Co.)를 이용하여 OCCM-30과 ALCS 세포 에서 total RNA를 분리하고 0.5 µg of Oligo d (T)와 1 µl (50 U)의 Superscript III enzyme (Invitrogen)을 이용하여 50°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR 조건은 Fas와 FasL 모두 94°C에서 5 분 denaturation 후에 94°C: 30 s; 55°C: 30 s; 72°C: 45 s의 32 cycle을 수행하고 72°C에서 7분간 처리하였다. 사용된 primer sequence는 다음과 같다.

(F/R) Fas: 5'-GAC TGC AAA ATG AAT GGG GGT-3'/5'-AGT GTC TGG GGT TGA TTT TC-3', (F/R) FasL: 5'-TCA GTT TTT CCC TGT CCA TCT -3'/5'-TGG GGT TGG CTA TTT GCT TT-3', (F/R) GAPDH: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'/5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG T-3'. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 관찰 하였다.

8. 단백질 전기영동과 western 분석

10% acrylamide gel을 이용하여 세포에서 추출한 30 μ g의 단백질을 전기영동 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하였다. 그 후 Gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel)에 transfer하여 0.1% tween-20을 포함한 PBS(PBS-T)에 skim milk가 5%가 되도록 녹인 blocking buffer로 blocking 하고 PBS-T로 세척 후 1:2500으로 희석한 anti-Fas (AF435, R&D system), -FasL (sc-19988, santacruz), -Cas-3 (sc-7148, santacruz), 및 -Cas-8 (sc-7890, santacruz) 항체에 4°C에서 overnight 반응 시켰다. Membrane 세척 후 horseradish peroxidase conjugated antirabbit-IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)를 1시간 반응 후 enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)으로 확인하였다.

9. Fas 길항제 Kp7-6의 처치

법랑모세포가 백악모세포에 의한 Fas-FasL 경로를 통한 세포사멸로부터 차단될 수 있도록 Fas-FasL 경로 길항제로 알려진 Kp7-6 (341291, Calbiochem, Germany)를 25ug/ml의 농도로 처리 한 후(Hasegawa 등, 2004), ALCS와 OCCM-30 세포를 co-culture하고 세포사멸을 comet assay와 TUNEL 염색을 통하여 확인하였다.

III. 결 과

1. 백악모세포(OCCM-30)가 법랑모세포(ALCS)와 구강상피세포(KB)의 증식에 미치는 영향

법랑모세포는 백악모세포 조건배지를 처리하였을 때, 조건배지를 하지 않은 군에 비하여 세포 증식율이 감소하였다(Fig. 1B). 또한 법랑모세포 증식율은 MEM과 DMEM 등의 종류가 다른 배지의 사용에 의하여도 다소 차이가 나타났다. 그러나 구강상피세포는 백악모세포 조건배지를 처리하였을 때나 조건배지를 처리하지 않았을 때 증식율의 차이가 없었다(Fig. 1C).

2. 백악모세포주(OCCM-30)와 법랑모세포(ALCS)의 co-culture가 두 세포의 사멸에 미치는 영향

세포사멸을 확인하는 DNA fragmentation 관찰에서 법랑모세포는 백악모세포와 co-culture 하였을 때 세포사멸을 나타내는 DNA fragmentation이 관찰되었으나, 백악모세포에서는 DNA fragmentation이 관찰되지 않았다(Fig. 1D). 또한 백악모세포와 co-culture한 구강상피세포에서도 DNA fragmentation은 관찰되지 않았다(data not shown).

개개 세포의 세포사멸을 확인하는 comet assay에서 정상 법랑모세포와 백악모세포는 comet 반응이 나타나지 않았다(Fig. 2A, B). 그러나 백악모세포와 co-culture한 법랑모세포는 강한 comet 반응을 나타냈다(Fig. 2C). 반면에 법랑모세포와 co-culture한 백악모세포는 comet 반응이 나타나지 않았다(Fig. 2D). Comet 반응을 나타내는 co-culture한 법랑모세포들은 정상 법랑모세포에 비하여 comet 길이와 높이 그리고 tail의 길이가 증가하였으며(Fig. 2E), head 부위의 DNA 비율은 감소하였으나, tail 부분의 DNA 비율은 증가하였다(Fig. 2F).

전체적으로 세포사멸을 확인할 수 있는 TUNEL 염색에서 정상 법랑모세포는 배양 3일, 5일, 및 7일 후에도 세포사멸의 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 3B, C, D). 그러나 백악모세포와 co-culture한 법랑모세포는 co-culture 3일, 5일, 및 7일 후에 따라 TUNEL 양성 세포들이 현저히 증가하였다(Fig. 3F, G, H). 음성대조군의 TUNEL 염색에서는 양성세포를 확인할 수 없었으나, DNAase I을 처리한 양성대조군에서는 TUNEL 양성 세포들이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 3A, E).

3. 백악모세포주(OCCM-30)와 법랑모세포(ALCS)의 co-culture 가 법랑모세포주의 Fas-FasL 세포 사멸 경로에 미치는 영향

법랑모세포와 백악모세포의 co-culture 결과 법랑모세포는 배양과정 동안 Fas mRNA와 단백질의 발현이 증가하였으나, 백악모세포에서는 FasL mRNA와 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 4A, B).

법랑모세포와 백악모세포의 co-culture 결과 Fas-FasL 세포 사멸 경로에서 중요한 역할을 하는 Pro-cas-8과 Pro-Cas-3의 cleavage form이 법랑모세포와 백악모세포에서 모두 증가하였다(Fig. 4B).

4. Fas-FasL 길항제를 이용한 법랑모세포(ALCS) 세포사멸의 회복

백악모세포에 의한 법랑모세포의 세포사멸이 Fas-FasL 세포 사멸 경로를 통한 것인지 확인하기 위하여 Fas-FasL의 길항제인 Kp7-6를 이용하였다. 정상 법랑모세포와 비교하여 백악모세포에 의하여 증가된 comet 반응이 Fas-FasL의 길항제인 Kp7-6 처리한 후 현저히 감소하였다(Fig. 5A, B, C). 백악모세포와 co-culture한 법랑모세포들을 Kp7-6 처리한 후 comet 길이와 높이 그리고 tail의 길이가 감소하였으며(Fig. 5D), head 부위의 DNA 비율은 증가하였으나, tail 부분의 DNA 비율은 감소하였다(Fig. 5E).

TUNEL 염색에서 정상 법랑모세포에서는 TUNEL 양성 세포들을 거의 관찰할 수 없었으나, 백악모세포와 co-culture한 법랑모세포들은 TUNEL 양성 세포들이 현저히 증가하였으며 Kp7-6 처리한 후에는 TUNEL 양성 세포들이 다소 감소하였다(Fig. 5F, G, H).

IV. 고 찰

치아발생의 후기종시기에 법랑질 형성하는 내측법랑상피와 외측법랑상피들이 치경륜(cervical loop)에서 증식하여 두층의 상피로 구성된 HERS를 형성한다(Tummers와 Thesleff, 2003). 이 시기에 치경륜의 내측법랑상피와 외측법랑상피들사이에는 법랑기의 정상세망(stellete reticulum)세포는 존재하지 않는다. 이 치경륜을 구성하는 세포들은 법랑모세포로 분화할 수 있고(Harada 등, 2006), 치유두의 외배엽성간엽세포와 상호작용하여 법랑질을 형성할 수 있다(Chai 등, 2000). 또한, Shinmura 등(2008)은 돼지에서 Malassez 상피세포 잔사(ERM)를 치관이 형성되는 시기의 치수세포와 상호작용하게 하면 Malassez 상피세포 잔사로부터 법랑모세포가 분화하고 법랑질과 유사한 조직을 만들 수 있다고 하였다. 결국 치경륜과 HERS 그리고 Malassez 상피세포 잔사는 발생학적으로 법랑질을 형성하는 법랑모세포에서 기원한 것이다. 따라서 이 연구에서는 법랑질을 형성하는 법랑모세포계의 세포들이 HERS 세포를 구성하고 HERS 세포들이 법랑모세포로 분화하여 법랑질을 형성할 수 있다는 사실을 근거로 HERS 세포와 백악모세포의 상호 작용을 법랑모세포주와 백악모세포주를 이용하여 연구하였다.

회취 치근형성과정을 전자현미경으로 관찰한 연구에서 Cho와 Garant (1988)는 두층의 HERS 세포의 바깥쪽 바닥막이 먼저 붕괴되어 치낭의 세포들이 침투해 들어와서 다시 안쪽 바닥막을 뚫고 들어가는 것은 HERS 세포의 붕괴와 백악모세포전구세포(precementoblast)의 분화가 거의 동시에 일어나기 때문에 나타나는 현상이라고 하였다. 이는 HERS의 내측의 세포는 분화하는 치근의 외배엽성간엽세포와 오랫동안 접촉하여 치근 상아모세포의 분화를 유도하는 역할을 할 수 있지만, 외측의 세포는 치낭의 세포가 백악모세포전구세포로 분화하면서 HERS 세포를 바로 뚫고 들어오는 짧은 시간 외배엽성간엽세포와 접촉하기 때문에 백악모세포의 분화를 유도할 가능성이 많지

않다는 사실을 의미한다. 따라서 치낭의 외배엽성 간엽세포가 짧은 시간에 HERS의 외측세포들을 뚫고 들어 올수 있다는 것은 치낭의 세포가 이동하면서 HERS 세포의 변화를 유도했을 가능성을 나타낸다.

치근의 형성과정에서 HERS세포의 운명과 기능에 관하여는 아직까지 명확히 알려져 있지 않으나, 현재까지 적어도 여섯 가지의 이론이 제기되고 있다: 1) 세포사멸과정을 통하여 죽는다(Kaneko 등, 1999; Cerri 등, 2000; 2009; Gonclaves 등, 2008). 2) Malassez 상피세포 잔사가 된다(Wentz 등, 1950; Cerri 등, 2000). 3) 백악질 형성이 진행되면서 백악질에 합입된다(Luan 등, 2006). 4) 상피-간엽 변환을 통하여 백악모세포가 된다(Kaneko 등, 1999; Sonoyama 등, 2007). 5) 치근면으로 부터 치주인때 쪽으로 이동한다(Andujar 등, 1985). 6) 백악모세포로 분화 한다(Zeichner-David 등, 2003; Sonoyama 등, 2007).

백악모세포의 세포 기원과 관련하여는 현재까지도 논란이 많다. Bernard Gottlieb의 사람과 돼지의 다양한 표본을 관찰한 결과 백악질형성이 시작되기 전에 HERS세포들이 치근면에서 분리되고 세포들이 서로 떨어져 그물모양의 세포 덩어리를 만든다고 하였다(Diekwisch 등, 2001). 이는 HERS 세포들이 직접 백악모세포로 분화하지는 않으며 치낭의 외배엽성간엽세포들이 백악모세포로 분화함을 간접적으로 시사한다. 또한, 최근에 Yamamoto와 Takahashi (2009)는 흰쥐 백악질 형성과정의 keratin, vimentin 및 Runx2 면역조직화학적 연구에서 HERS 세포에서 상피-간엽 변환은 일어나지 않으며 무세포성이나 세포성백악질은 모두 치낭의 세포에서 기원한다고 하였다. 그러나 이에 대한 반론도 많다. Zeichner-David 등(2003)은 불멸화된 HERS-유래 세포주의 세포배양을 통하여 HERS 세포들이 배양초기에는 범랑질-특이 단백질들을 분비하지만 이어서 무세포성백악질과 유사한 석회화결절을 형성한다고하여 백악모세포의 기원이 치낭의 세포뿐만 아니라 외배엽 기원의 HERS 세포일 가능성을 시사하였다. 이와 유사하게 Rincon 등(2005)은 HERS에서 유래한 Malassez 상피세포 잔사가 뼈와 백악질에서 나타나는 bonisialoprotein

(BSP)과 osteopontin (OPN)을 분비할 수 있는 세포인 점으로 보아 Malassez 상피세포 잔사가 백악모세포로 분화하여 치주조직을 재생할 수 있는 특성을 보유하고 있다고 하였다. 또한, HERS 세포들은 치근형성과정에서 붕괴되기 전이나 붕괴되는 도중에 단백질을 합성하고 분비할 수 있는 세포들인데, 이들 세포 중에서 일부는 법랑모세포와 유사한 특성을 나타내고, 다른 세포들은 치근면에서 떨어져서 백악모세포의 형태학적 특징을 보인다고 하여 (Bosshardt와 Nanci, 2004), HERS 세포가 백악모세포로 분화할 수 있음을 밝혔다. 흥미롭게도 최근에 Huang 등(2009)은 K14-Cre;R26R 생쥐를 이용한 실험에서 HERS세포는 치근형성 때에 백악질에 대부분 붙어 있으며 백악모세포와 백악세포로 분화하여 무세포성과 세포성 백악질을 형성하고, 일부의 세포는 Malassez 상피세포 잔사가 된다고 하였다. 이 과정에서 HERS세포의 일부는 서로 분리되지만 대부분의 세포들은 분리되어 떨어지는 것이 아니라 서로 연결되어 그물모양으로 존재하면서 세포들끼리 계속 교통하고 고유의 기능을 수행한다. 이 연구 결과는 백악모세포의 기원은 HERS 세포와 치낭의 외배엽성간엽세포이며 이 과정에서 HERS 세포의 세포사멸은 거의 일어나지 않는다는 것이다. 이와 같이 HERS 세포가 치근형성과정에서 사멸되는지 또는 그렇지 않은지의 여부는 백악모세포의 기원과 백악질형성과정을 이해하는데에도 중요한 요소이다.

치근형성과정에서 HERS 세포의 세포사멸에 관하여도 현재까지 많은 논란이 계속되고 있다. Suzuki 등(2002)은 치근발생과정에서 분절화된 HERS 사이로 이주한 외배엽성간엽세포로부터 백악질이 합성되면 이 세포들과 HERS 세포가 세포덩어리를 만들고 그 둘레에 다시 바닥막이 생겨난다고 하였다. 결국 HERS 세포가 죽어서 HERS가 분절화 되는 것은 아니라는 것이다. 또한, 돼지 대구치 치근발생과정의 형태학적 및 면역조직화학적 연구에서 분절화된 HERS의 대부분은 치주인대 내에 남게 되고 아주 일부의 세포들이 백악질에 묻혀서 백악세포(cementocyte)와 연결되어 있는데 이 세포들이 세포사멸 과정을 통하여 죽는다고 하여, HERS의 세포사멸이 아주 미미하다고 하

였다(SuZuki 등, 2006). Luan 등(2006)도 HERS세포에서 세포사멸이 일어나지만 이는 실제로 많지 않은 양이며 HERS의 대부분은 살아있는 Malassez 상피세포 잔사 형태로 치주인대에 존재한다고 하였다. 그러나, Diekwisch 등(2001)은 치근형성의 전자현미경관찰에서 치근 상아모세포와 HERS 세포들 사이에 바닥막이 존재하다가 치낭으로부터 외배엽성간엽세포가 상아질 표면으로 접근해가면서 외배엽성간엽세포와 상아질사이에는 바닥막이 없어지고, 이어서 백악모세포가 분화하여 백악질을 형성하면 HERS 세포들의 내부에 초생달 모양(crescent-shape)의 공간이 나타나게 되는데 이것이 세포사멸의 증거라고 하였다. 또한, Cerri 등(2000)은 치주조직이 HERS와 외배엽성간엽세포로부터 형성되는데 이 과정에서 조직의 빠른 개조가 일어나고 특히 HERS 세포가 사멸되는 것이 치주조직의 형성에 중요하다고 하였다. 흰쥐를 이용한 연구에서 치경부와 중앙부위 또는 치근분지부 등에서 전체적으로 Malassez 상피세포 잔사의 숫자가 나이가 들어감에 따라 감소하고 일부는 세포사멸에 의하여 죽는다고 하였으며(Gonclaves et al, 2008; Cerri et al, 2009), TUNEL과 전자현미경관찰에서도 Malassez 상피세포 잔사가 구형 또는 난원형의 치밀체를 가지면서 TUNEL 양성반응을 나타내고, 형태학적으로 염색질이 농축되고 세포질이 위축되는 등의 전형적인 세포사멸 소견을 나타낸다고 하여 치근형성과정에서 HERS 세포의 사멸을 확인하였다(Cerri 와 Katchburian, 2005).

이 연구에서 법랑모세포와 백악모세포의 co-culture 결과 법랑모세포에서는 DNA fragmentation, comet assay 및 TUNEL 염색 등의 다양한 방법으로 세포사멸이 확인되었으나, 구강상피세포(KB)에서는 세포사멸이 관찰되지 않았다. 또한, 법랑모세포와 백악모세포를 co-culture 하면 법랑모세포에서는 Fas mRNA와 단백질의 발현이 증가하였고 백악모세포에서는 FasL mRNA와 단백질의 발현이 증가하였다. Fas-FasL의 길항제인 Kp7-6(Hasegawa 등, 2003)을 처리하면 백악모세포에 의한 법랑모세포의 세포사멸이 감소하였다. 이 결과는 치근 형성과정에서 법랑모세포 유래 HERS 세포와 분화하는 백악

모세포가 서로 상호작용한 결과 Fas-FasL 경로를 통하여 HERS의 세포사멸이 유도됨을 시사한다.

V. 참고문헌

Andujar MB, Magloire H, Grimaud JA. (1984) Fibronectin in basement membrane of Hertwig's epithelial root sheath. Light and electronimmunohistochemical localization. *Histochemistry* 81:279-282.

Andujar MB, Magloire H, Hartmann DJ, Ville G, Grimaud JA. (1985) Early mouse molar root development: cellular changes and distribution of fibronectin, laminin, and type -IV collagen. *Differentiation* 30:111-122.

Bosshardt DD, Nanci A. (2004) Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol* 31(3):184-92.

Cerri PS, Freymüller E, Katchburian E. (2000) Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec* 258(2):136-44.

Cerri PS, Gonçalves Jde S, Sasso-Cerri E. (2009) Area of rests of Malassez in young and adult rat molars: evidences in the formation of large rests. *Anat Rec (Hoboken)* 292(2):285-91.

Cerri PS, Katchburian E. (2005) Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 40(5):365-72.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. (2000) Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127(8):1671-1679.

Cho MI, Garant PR. (1988) Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodontal Res* 1988;23:268-276.

Cho MI, Garant PR. (2000) Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 24:9-27.

D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, Stayhorn CL, Windle JJ, Somerman MJ. (2000) Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts *in vitro*. *J Periodontol* 71:63-72.

Diekwisch TG. (2001) The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 45(5-6):695-706.

Diekwisch TG. (2002) Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect Tissue Res* 43(2-3), 245-256.

Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ. (2007) Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol* 78:47-126.

Gonçalves JS, Sasso-Cerri E, Cerri PS. (2008) Cell death and quantitative reduction of rests of Malassez according to age. *J Periodontal Res* 43(4):478-81.

Harada H, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Kawano S, Katsube K, Wakisaka S. (2006) Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 10;340(2):611-616.

Hasegawa A, Cheng X, Kajino K, Berezov A, Murata K, Nakayama T, Yagita H, Murali R, Greene MI. (2003) Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 27;101(17):6599-6604.

Huang X, Bringas P Jr, Slavkin HC, Chai Y. (2009) Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol* 334(1):22-30.

Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono M. (1999) Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res* 298(1):95-103.

Luan X, Ito Y, Diekwisch TG. (2006) Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn* 235(5):1167-80.

Nakata A, Kameda A, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. (2003) Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 308:834-839.

Owens PD. (1978) Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol* 23:91-104.

Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. (2005) Production of osteopontin by cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontal Res* 40(5):417-26.

Rincon JC, Young WG, Bartold PM. (2006) The epithelial cell rests of

Malassez - a role in periodontal regeneration? *J Periodontal Res* 41(4):245-52.

Shinmura Y, Tsuchiya S, Hata K, Honda MJ. (2008) Quiescent epithelial cell rests of Malassez can differentiate into ameloblast-like cells. *J Cell Physiol* 217(3):728-38.

Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S. (2007) Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* 86(7):594-9.

Suzuki M, Inoue T, Shimono M, Yamada S. (2002) Behavior of epithelial root sheath during tooth root formation in porcine molars: TUNEL, TEM, and immunohistochemical studies. *Anat Embryol (Berl)* 206(1-2):13-20.

Suzuki M, Matsuzaka K, Yamada S, Shimono M, Abiko Y, Inoue T. (2006) Morphology of Malassez's epithelial rest-like cells in the cementum: transmission electron microscopy, immunohistochemical, and TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling studies. *J Periodontal Res* 41(4):280-7.

Thomas HF (1995) Root formation. *Int J Dev Biol* 39:231-237.

Tummers M, Thesleff I. (2003) [Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species.](#) *Development* 2003 Mar;130(6):1049-57.

Wentz FM, Weinmann JP, Schour I. (1950) The prevalence, distribution, and morphologic changes of the epithelial remnants in the molar region of the rat. *J Dent Res* 29:637-646.

Yamamoto T, Takahashi S. (2009) Hertwig's epithelial root sheath cells do not transform into cementoblasts in rat molar cementogenesis. *Ann Anat* 191(6):547-55.

Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P Jr. (2003) Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 228(4):651-63.

사진부도설명

Fig. 1. Effect of OCCM-CM on the proliferation of ALCs and KB cells and the apoptosis of ALCS. The proliferation was measured by MTT assay and the apoptosis was also observed by genomic DNA fragmentation. The proliferation rates of ALCs were found to be decreased compare with their control counterparts while they were not changed in KB cells after the co-culture with OCCM30. Genomic DNA fragmentation indicating apoptosis was evident in ALCS after the co-culture with OCCM30. (A) The model of co-culture system between ALCs and OCCM30. (B) Proliferation of ALCs after co-culture with OCCM30. (C) Proliferation of KB after co-culture with OCCM30. (D) Genomic DNA fragmentation of ALCs and OCCM30 after co-culture.

Fig. 2. Comet assay for the detection of apoptosis in single cell. Harvested cells at day 3 were lysed, seeded agarose coated slides, and electrophoresed in alkaline buffer. After EtBr staining, cells were observed using light microscope. Co-cultured ALCs shows more comet number and longer tail than control. However, OCCM30 did not show any differences between control and co-culture. (A, C) ALCs. (B, D) OCCM30. Magnification; $\times 200$. (E, F) The data were analyzed by comet score15 program, which include comet length and height, and DNA percentage in head and tail.

Fig. 3. TUNEL assay for the detection of apoptosis in control and co-cultured ALCs. Cultured cells on cover slips were fixed, and TUNEL assay was performed according to manufacture's instructions. As time goes on during the culture, TUNEL positive cells were increased in

co-cultured ALCS. (A) Negative control. (B) Control 3-day. (C) Control 5-day. (D) Control 7-day. (E) Positive control (DNase I treatment). (F) 3 days after co-culture. (G) 5 days after co-culture. (H) 7 days after co-culture. Magnification ; $\times 400$.

Fig. 4. Expression of Fas and FasL mRNA and proteins in control and co-cultured ALCs analyzed by RT-PCR and western blot. OCCM30 increased Fas expression in ALCs whereas ALCs increased FasL expression in OCCM30. (A) RT-PCR. (B) Western blot.

Fig. 5. The apoptosis was analysed by Comet and TUNEL after the treatment of Fas antagonist, Kp7-6, during co-culture. The apoptosis was partially recovered by the treatment of Fas antagonist compared to co-culture in ALCs. (A) control ALCs, (B) co-cultured ALCS, (C) Kp7-6 treated ALCS, (D, E) The data were analyzed by comet score15 program, which include comet length and height, and DNA percentage in head and tail. (F) control ALCs, (G) co-cultured ALCS, (H) Kp7-6 treated ALCS, (A-E); comet assay, Magnification; X 200. (F-H); TUNEL assay. (A) Control. (B) Co-culture. Magnification; X 400.

사진부도

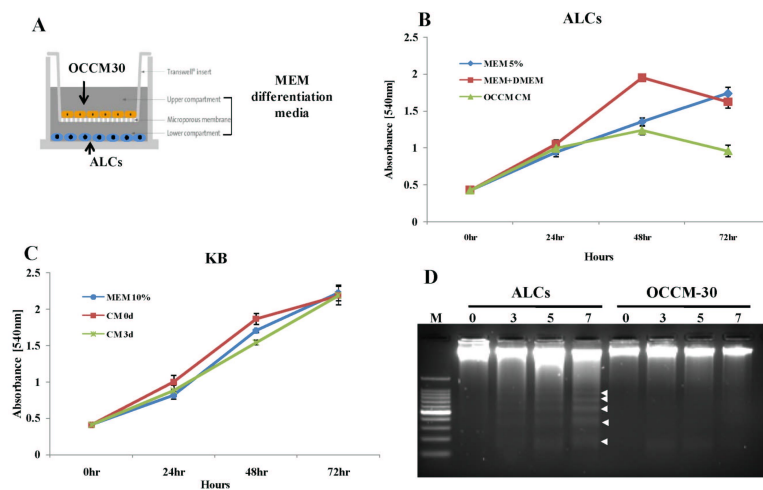


Fig. 1.

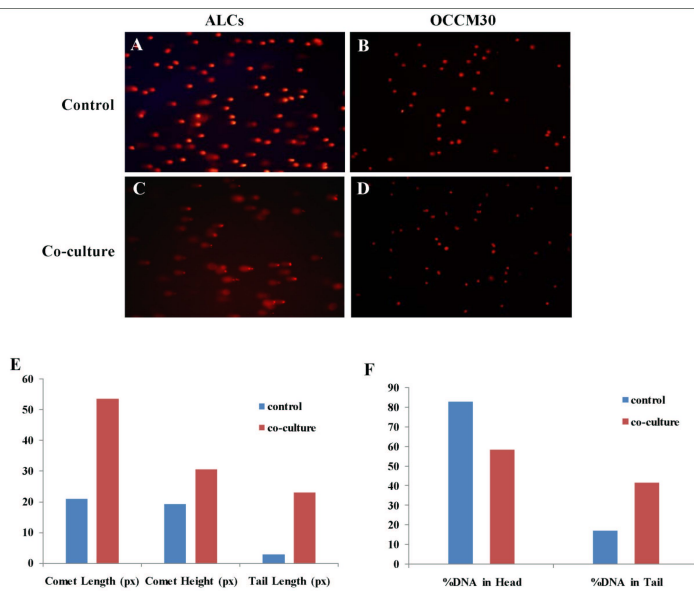


Fig. 2.

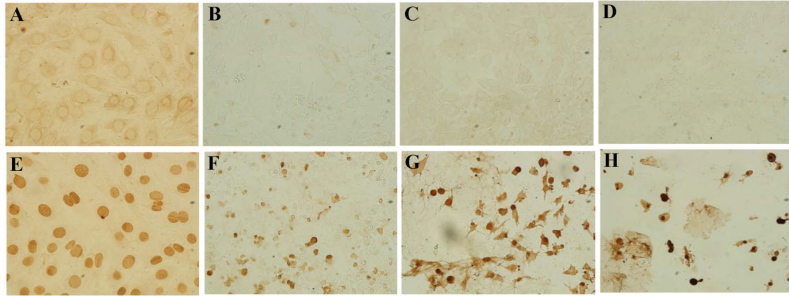


Fig. 3.

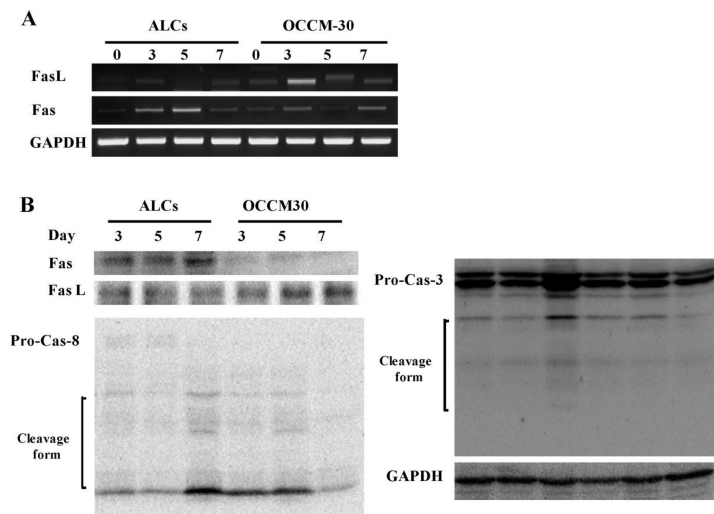


Fig. 4.

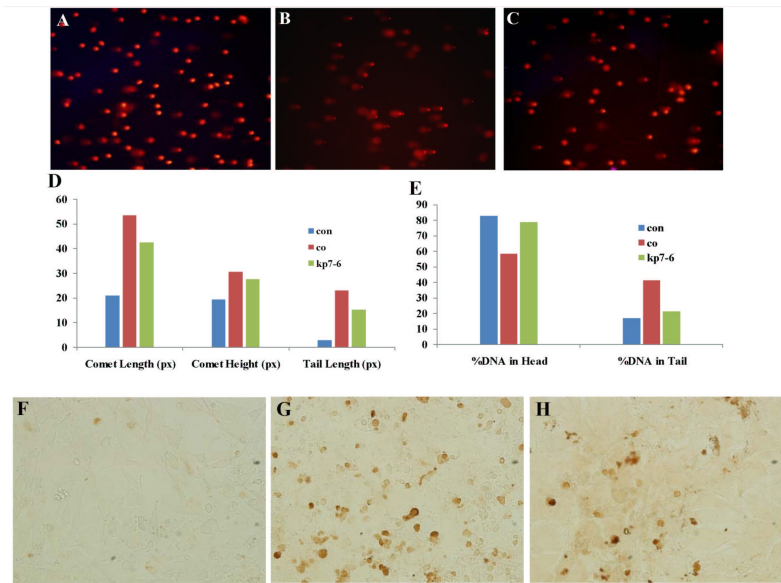


Fig. 5.

저작물 이용 허락서

학 과	치의생명공학과	학 번	20087448	과 정	박사
성 명	한글: 김 성 일 한문 : 김 성 일 영문 : Kim, Sungil				
주 소	540-979 전남 순천시 조례동 1721-8				
연락처	E-MAIL :				
논문제목	한글 : 백악모세포가 법랑모세포의 세포사멸에 미치는 영향				
	영문 : Effects of cementoblasts on the apoptosis of ameloblasts <i>in vitro</i>				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대()

2010 년 2 월 일

저작자: 김 성 일 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하