

Roles of Sonic Hedgehog Signaling During Tooth Root and Periodontium Formation

Jaewon Hwang¹, Eui-sic Cho¹, Yeonmi Yang²

¹Cluster for Craniofacial Development and Regeneration Research, Institute of Oral Bioscience,
School of Dentistry, Chonbuk National University

²Department of Pediatric Dentistry and Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Chonbuk National University

Abstract

The aim of this study was to understand the roles of Sonic Hedgehog (SHH) signaling during tooth root and periodontium formation. In this study, we generated the dental mesenchyme-specific Smoothed (Smo) activated/inactivated mice with the activity of Cre recombinase under the control of osteocalcin promoter.

In the Smo activated mutant molar sections at the postnatal 28 days, we found extremely thin root dentin and widened pulp chamber. Picrosirius red staining showed loosely arranged fibers in the periodontal space and decreased cellular cementum with some root resorption. Immunohistochemical staining showed less localization of matrix proteins such as Bsp, Dmp1, Pstn, and Ank in the cementum, periodontal ligament, and/or cementoblast.

In the Smo inactivated mutant mouse, there was not any remarkable differences in the localization of these matrix proteins compared with the wild type. These findings suggest that adequate suppressing regulation of SHH signaling is required in the development of tooth root and periodontium.

Key words : Sonic Hedgehog signaling, Smoothed, Periodontium

I. 서 론

Hedgehog signaling은 발생과정에서 상피와 간엽간의 상호 작용을 매개하여 세포의 증식, 이주, 분화 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[1]. Sonic Hedgehog (SHH)은 치아발생 초기 부터 치관이 형성되는 시기까지 치아 발생의 전 과정에 걸쳐 구강상피에서 발현되는 대표적인 상피성 신호전달물질로서, 인접 세포의 세포막에 있는 Patched receptor (Ptch1)에 결합하여 Smoothed (Smo)의 방출을 유도함으로써 SHH signaling의

세포내 신호전달을 유도한다(Fig. 1). Smo는 G-protein coupled receptor protein으로 SHH signaling을 매개하는 전사조절인자 인 Gli1, 2의 활성화 및 핵 내 이동을 유도하여 target 유전자의 발현을 촉진시키게 된다. Shh가 Ptch1에 오지 않을 때에는 Smo가 Ptch1과 결합되어 Gli1, 2를 활성화시키지 못하고, repressor 인 Gli3가 핵 안으로 들어가서 target 유전자의 발현을 억제하게 된다[2].

SHH signaling은 초기 치아발생에서 그 역할이 비교적 잘 알려져 있으나, 치근 및 치주조직이 형성되는 후기 치아발생과정

Corresponding author : Yeonmi Yang

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Chonbuk National University, 20, Geonji-ro, Deokjin-gu, Jeonju, 54907, Korea

Tel: +82-63-250-2212 / Fax: +82-63-250-2131 / E-mail: pedo1997@jbnu.ac.kr

Received August 4, 2017 / Revised October 17, 2017 / Accepted September 22, 2017

※This paper was supported by Fund of Biomedical Research Institute, Chonbuk National University Hospital in 2011.

에서는 잘 알려져 있지 않다. Khan 등[3]은 발생 중인 치근에서 SHH signaling 관련인자들의 발현양상을 시기별로 확인하였는데, 생후 10일 된 생쥐에서, Shh가 초기치근과 cervical margin부위에서 발현되지 않고 Hertwig's epithelial root sheath (HERS)에서만 특이적으로 발현되었다. 동일한 시기에 Ptch1은 HERS에서 강하게 발현되고 치아유두와 치근의 follicle 간엽세포 주위에서도 발현되었다. Smo는 치관과 HERS를 따라 치근이개부까지 발현되어 있었고 Gli1은 Ptch1과 유사하게 HERS에서 강하게 발현되었으며 치근의 간엽에서도 발현이 증가하였다. Gli2와 Gli3는 HERS와 간엽 모두에서 발현되었지만 Gli2는 치근이개부와 인접한 치아유두에서 강하게 발현되었다. 제 1대구치의 치근 형성이 대부분 완성되는 생후 20일경 Shh는 치근단 주변의 HERS에 발현이 관찰되었으며, Ptch1은 HERS 주변에서 강하게 발현되고 있었지만 HERS에서는 발현이 감소하였다. Smo는 생후 10일과 유사하게 치관과 치근의 상아모세포, HERS, 치근이개부에서 발현되었고 치수까지 확대되었다. Gli1과 Gli3은 HERS와 치근단 주변에서의 발현이 증가하였고 Gli2는 치관의 상아모세포에서는 강하게 발현되는 반면 치근단 쪽에서는 약하게 발현되는 것으로 나타났다[3].

리간드로 기능하는 Shh는 주로 치아상피에서 발현이 되지만 Smo, Ptch1, Gli와 같은 인자들은 상피와 간엽에서 모두 발현되기 때문에, SHH signaling은 치아발생과정에서 상피와 간엽의

상호작용을 매개하여 치근 및 치주조직의 발생과정에도 관여한다고 알려져 있다[3-6]. Huang 등[4]은 상피에서 조직특이적으로 TGF- β /BMP signaling을 차단했을 때 치근이 전혀 형성되지 않았으나, Shh beads를 넣었을 때 치근이 부분적으로 복구되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 TGF- β /BMP signaling이 SHH signaling을 통하여 Nfic의 발현을 조절함으로써 치근형성을 조절한다는 것을 의미한다. Nakatomi 등[5]은 비정상적인 Ptch1 단백질질을 가지고 있는 중간엽 이형성증 생쥐모델에서 HERS 주변의 세포 증식 감소, 구치의 맹출 지연, 짧은 치근 길이 등의 표현형을 보고하였다. 또한 Kim 등[6]은 치근상아모세포의 분화실패를 보이는 Nfic 돌연변이 생쥐모델에서, Smo의 발현이 감소되는 것을 보여주어 SHH signaling이 치근형성에 역할을 하고 있음을 보여 주었다. 따라서 본 연구는 치근 및 치주조직의 형성과정에서 SHH signaling의 기능을 알아보기 위하여 SHH signaling의 세포 내 신호전달경로의 중심 매개체로 알려져 있는 Smo를 Cre-LoxP system을 이용하여 특정 조건하에서만 유전자적중이 일어나는 conditional knockout mouse를 사용하여 조직특이적으로 SHH signaling이 활성화 또는 차단되는 생쥐모델을 제작하여 분석하였다. 이는 Smo null mouse는 초기발생과정 중 사망하므로 치근 및 치주조직 형성 과정에 대한 연구를 수행하기에 부적합하기 때문이다[7].

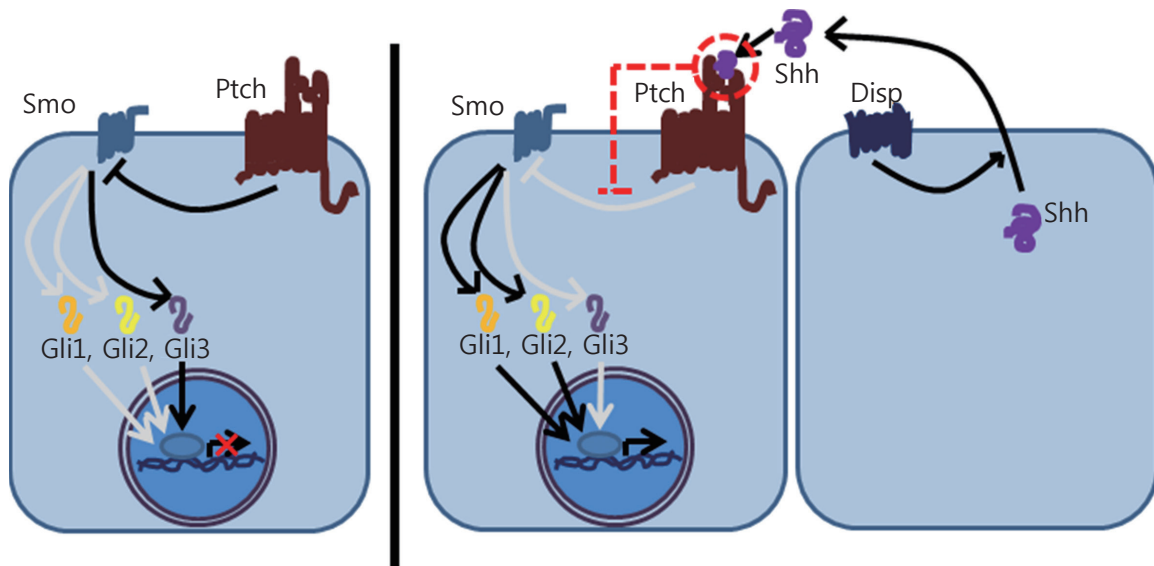


Fig. 1. A brief illustration of SHH signaling pathway. In the absence of Shh, Patched (Ptch), a 12-pass transmembrane protein and a putative receptor for SHH, represses the signaling activity of a seven-pass transmembrane protein, Smoothed (Smo). Binding of Shh to Ptch relieves this inhibitory effect and allows a zinc-finger-type transcription factor Gli to enter the nucleus, where it regulates transcription.

II. 연구 재료 및 방법

1. Mouse strains

본 연구에서는 치성간엽에서 조직특이적으로 Smo 유전자를 적중하여 Smo가 활성화(activation) 또는 차단(inactivation) 되는 생쥐 모델의 제작을 위해, 생후 8주령의 *R26R-SmoM2* mouse와 *Smo^{co/co}* mouse를 각 *Osteocalcin-Cre* transgenic mouse와 교배하였다. 제작한 mutant mouse (MT mouse)의 genotype은 생후 10일된 mouse의 꼬리를 잘라 genomic DNA를 얻은 후 PCR을 시행하여 확인하였다. Smo 활성화(*OC-Cre:SmoM2*) 및 차단(*OC-Cre:Smo^{co/co}*) mutant mouse는 각각의 정상 유전자형 littermate인 wild type mouse (WT mouse)와 비교하여 분석되었다[8-10].

2. Smo 활성화(constitutive activation) 생쥐의 치아형태

생후 35일경 *OC-Cre:SmoM2* MT mouse의 모양과 전치 및 구치형태는 광학실체현미경하에 littermate WT mouse와 비교하여 분석되었다.

3. 조직표본제작 및 염색(Tissue preparation and staining)

치주조직의 발생학적 변화를 살펴보기 위하여 치근이 형성되는 시기인 생후 14일과 21일, 그리고 치근의 형성이 완료된 시기인 생후 28일, 35일, 56일의 돌연변이 및 대조군 마우스를 희생하여 상·하악골을 분리하였다. 이후 조직표본을 제작하기 위해 4% paraformaldehyde로 4°C에서 18시간 동안 고정하고, 28일간 17% EDTA 용액에서 탈회 한 후, phosphate-buffered saline (PBS)으로 수세하고 탈수와 투명과정을 거쳐 통상적인 방법에 따라 파라핀에 포매 하였다. 회전식 박절기를 이용하여 5 µm 두께의 조직절편을 제작하였다. 조직절편은 함수과정을 거쳐 hematoxylin and eosin (H-E) 염색과 교원질을 특이적으로 염색하는 Picrosirius red 염색을 실시하였다.

4. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

Smo 유전자 적중에 따른 단백질 변화를 살펴보기 위해 면역조직화학 염색이 시행되었다. 조직절편은 함수화 및 3% hydrogen peroxide 처리 후 제조사의 방법에 따라 Histostain Plus rabbit primary (DAB) kit (Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA)를 적용하였다. 1차 항체는 rabbit polyclonal

dentin matrix protein 1 (Dmp1, 1 : 500; Takara Bio Inc., Shiga, Japan), bone sialoprotein (Bsp, 1 : 1200; Abcam; Cambridge, MA, USA), Periostin (Pstn, 1 : 600; Abcam), ANKH (Ank, 1 : 150; Biorbyt, Cambridge, UK)를 사용하였으며, 발색과정 이후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 미세전산화단층촬영(Microcomputerized Tomography)

치근 및 치주조직의 형태이상 및 광화이상 유무를 확인하기 위해 생후 28일령의 WT mouse, *OC-Cre:SmoM2* activation mouse, *OC-Cre:Smo^{co/co}* inactivation mouse를 각각 희생하여 digitalized soft X-ray (softex csm-2; Softex Co. Ltd., Kanagawa, Japan)로 확인하였고, 보다 정밀한 분석을 위해 4% PFA로 고정 후 Micro-CT (1076 Skyscan Micro-CT, Skyscan, Kontich, Belgium) 촬영을 실시하고, CT scan software (Skyscan)를 이용하여 분석하였다.

III. 연구 성적

1. 치성간엽 특이적 Smo 활성화(constitutive activation) 모델의 치근 및 치주 표현형 분석 결과

생후 35일경 *OC-Cre:SmoM2* MT mouse는 littermate WT mouse에 비해 뚜렷이 작은 체구를 보였다(Fig. 2A). 광학현미경하에서 확인한 결과 MT mouse의 상·하악 전치는 뚜렷이 얇고 작았으나, 구치의 치관은 외형적 차이를 보이지 않았다(Fig. 2B - 2E).

쥐의 두경부를 digitalized soft X-ray를 이용하여 촬영한 결과 MT mouse는 전체적인 크기가 WT mouse에 비해 매우 작은 것을 확인할 수 있었으며 상·하악의 전치가 짧고 상·하악골이 작아 전치부 절단면 간 거리가 WT mouse에 비해 매우 컸다(Fig. 3A, 3B). Micro-CT를 촬영하여 관상면과 시상면으로 확인 해 본 결과, 하악 구치의 치관 형태나 크기는 큰 차이를 보이지 않았으나, WT mouse의 구치가 맹출이 완료된 이후에도 MT mouse는 덜 맹출되어 임상치관길이가 더 짧았다. MT mouse의 치근은 뚜렷이 짧고 얇아 넓은 치수강을 보였고, 하악골의 피질골 두께는 뚜렷한 감소를 보이며 특히 치근분지부 및 치관부에서 더욱 뚜렷하게 얇았다(Fig. 3C - 3F).

2. 치성간엽 특이적 Smo 활성화 모델의 조직학적 분석결과

생후 28일령 쥐의 하악 구치 시상면 조직절편을 H-E 염색하여 분석하였다. 저배율로 관찰한 결과 MT mouse 치아의 치관 크기

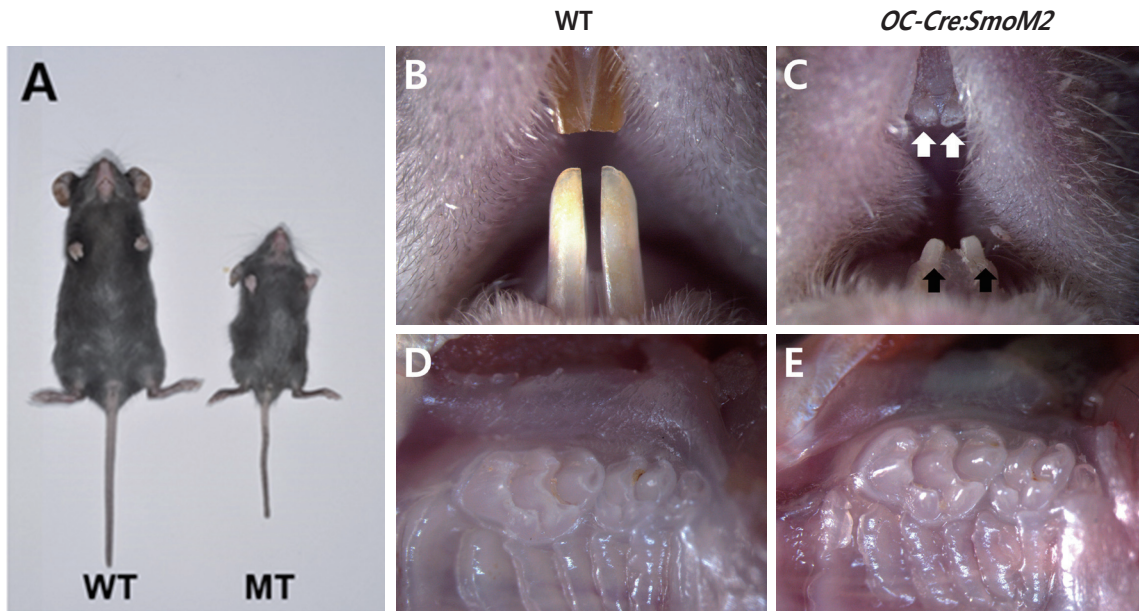


Fig. 2. Gross appearance and tooth morphology of WT and Smo activated MT mouse at P35. (A) The MT looks much smaller than WT. (B, C) Both maxillary and mandibular incisors are thinner and shorter than WT. (D, E) However, molars show no differences in size and morphology of crown between MT and WT mouse.

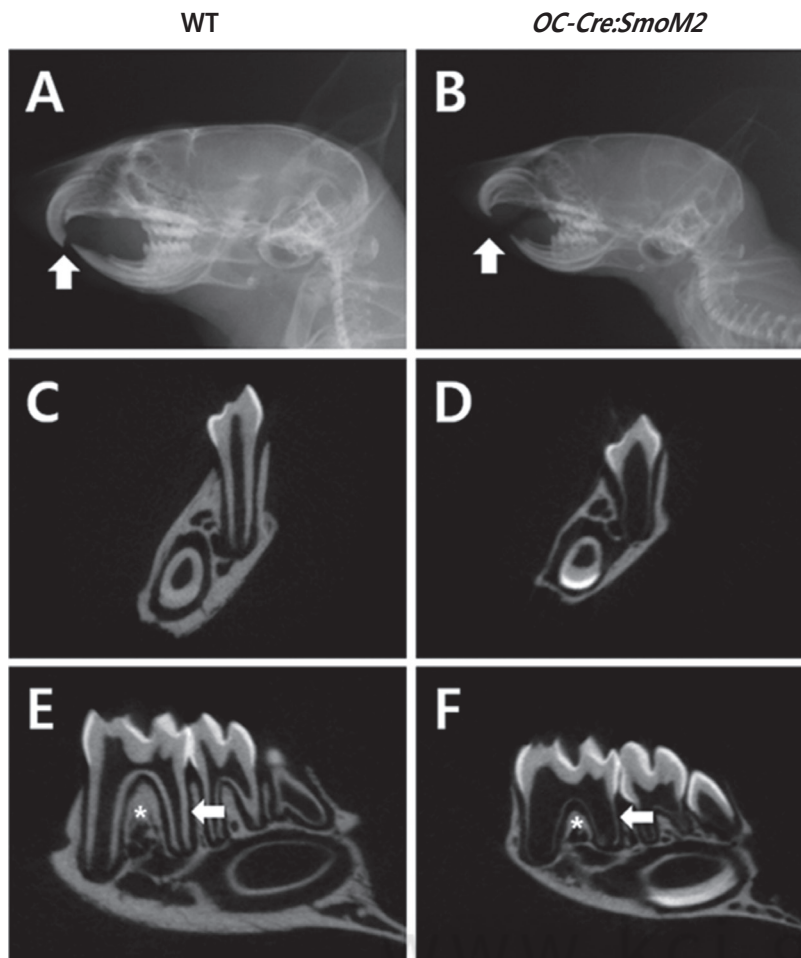


Fig. 3. Craniofacial skeleton and tooth root formation of WT and *OC-Cre:SmoM2* MT mouse at P35. (A, B) In microradiography, general dimensions of craniofacial skeleton in MT mouse are smaller than those in WT littermates. Particularly, mandible of MT is severely retarded and resulted in malocclusion. (C - F) Micro-computed tomographic views in the frontal and mid-sagittal sections of the mandibles obtained from WT and *OC-Cre:SmoM2* mouse at P35. Molars of MT mouse show thin and short tooth root than WT mouse. Particularly interseptal and interradicular bone formation are severely impaired in the MT mouse.

나 형태는 WT mouse와 차이를 보이지 않으나, 치근 길이가 짧고 치근상아질의 두께는 얇으며, 확장된 치수강을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A, 4B).

표현형을 더 자세히 관찰하기 위해 생후 14일, 21일, 28일경의 구치를 관상면으로 절단하여 H-E 염색 후 고배율로 관찰하였다. 실험 결과 WT mouse의 치근은 시간이 지남에 따라 치근상아질의 두께가 두꺼워졌으며 무세포성 백악질의 형성이 정상적으로 이루어지고 치주인대의 섬유다발이 백악질과 치조골 표면으로부터 뺏어 나와 치주인대 공간을 차지하고 있었다(Fig. 5A - 5C). 그러나 MT mouse의 치근은 생후 14일경부터 치주인대의 몇몇 섬유다발만이 백악질과 치조골 사이에 뺏어 나오고 있었으며 무세포성 백악질의 형성이상이 확인되었다(Fig. 5D - 5F).

치주인대의 밀도 감소는 교원질을 염색하는 Picrosirius red 염색을 시행하여 관찰하였다. MT mouse의 치근에서 무세포성 백악질이 정상적으로 형성된 부위에는 collagen fiber가 백악질과 치조골 사이에서 서로 연결이 되고 있는 반면에 백악질의 형성이상이 있는 부위에서는 collagen fiber가 닿지 않고 있는 것이 관찰되었다. 그리고 상대적으로 진한 염색성을 보이는 상아-백

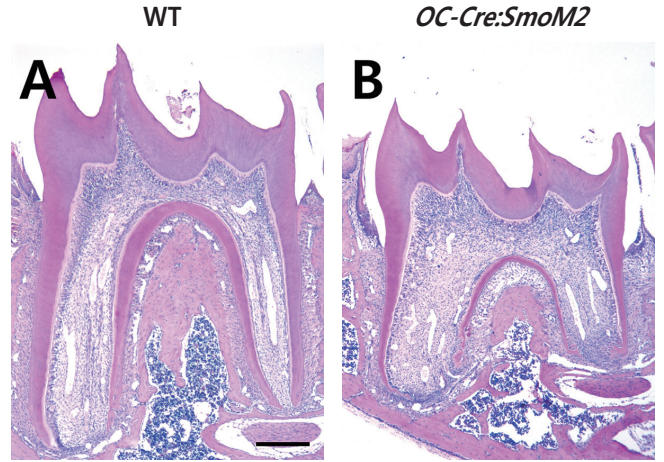


Fig. 4. Histological features of the mandibular first molar of WT and *OC-Cre:SmoM2* MT mouse at P28. (A, B) In the sagittal sections of the mandibular first molars, crown of mutant molar was similar in appearance and dimension with those of wild type littermates. However, root formation is severely impaired and resulted in thin and short roots and pulp chamber is widened in MT mouse (Scale bar = 250 μm).

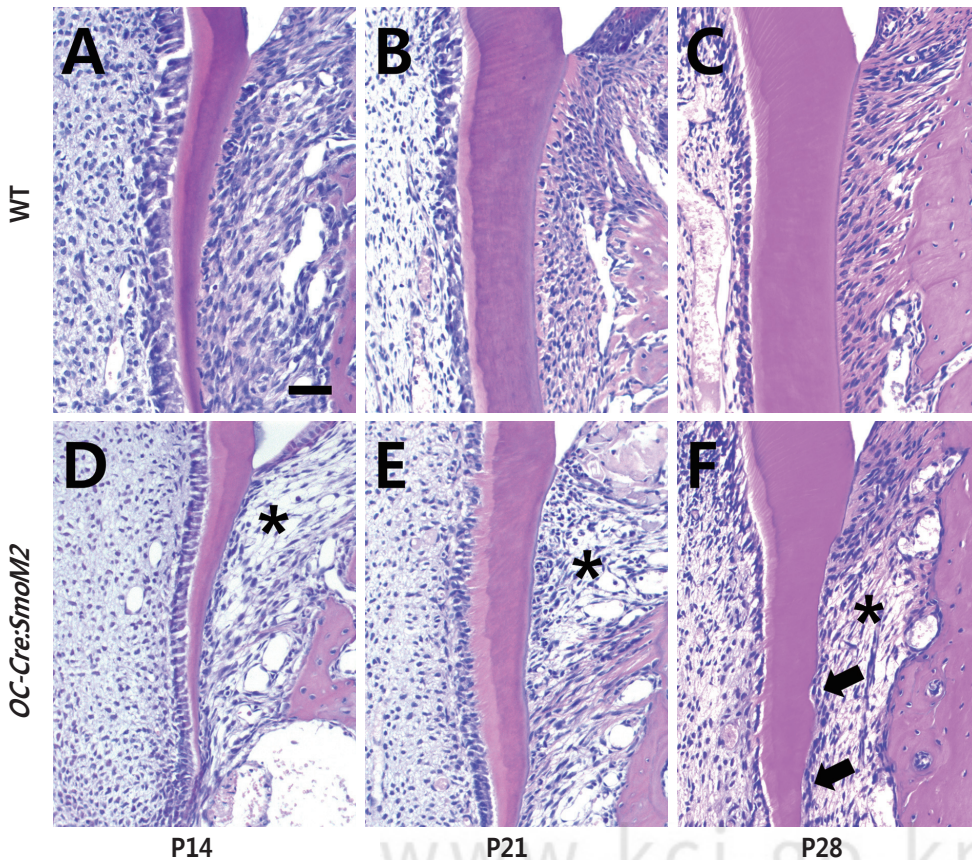


Fig. 5. H-E stained sections of WT and *OC-Cre:SmoM2* MT from 14 to 28 days of age. (A - F) In H-E-stained sections of mutant molars, root dentin width is clearly thin with impaired periodontium. Defects in cementum (black arrows) are observed particularly in cervical thirds of the roots of MT mouse. Periodontal ligaments (*) are poorly differentiated and less organized structure (Scale bar = 50 μm).

약경계가 MT mouse에서는 뚜렷하지 않으며, 치주인대공간에서는 백악법랑경계부위를 제외하고 교원질이 거의 염색되지 않았다(Fig. 6C, 6D). 면역조직화학염색시 치조골과 백악질의 표식자인 Bsp와 Dmp1의 발현 양상을 관찰한 결과 WT mouse에서는 무세포성 백악질을 따라 발현이 되었지만 MT mouse의 무세포

성 백악질에서는 불규칙하게 발현이 되고 있었다(Fig. 6E - 6H). 치주인대의 표식자인 Pstn은 MT mouse의 치주인대에서 발현이 크게 감소하였고(Fig. 6I, 6J), 백악모세포 표식자인 Ank도 MT mouse의 치근표면에서 발현의 감소를 보였다(Fig. 6K, 6L).

세포성 백악질의 표현형을 관찰하기 위해 생후 21일, 28일,

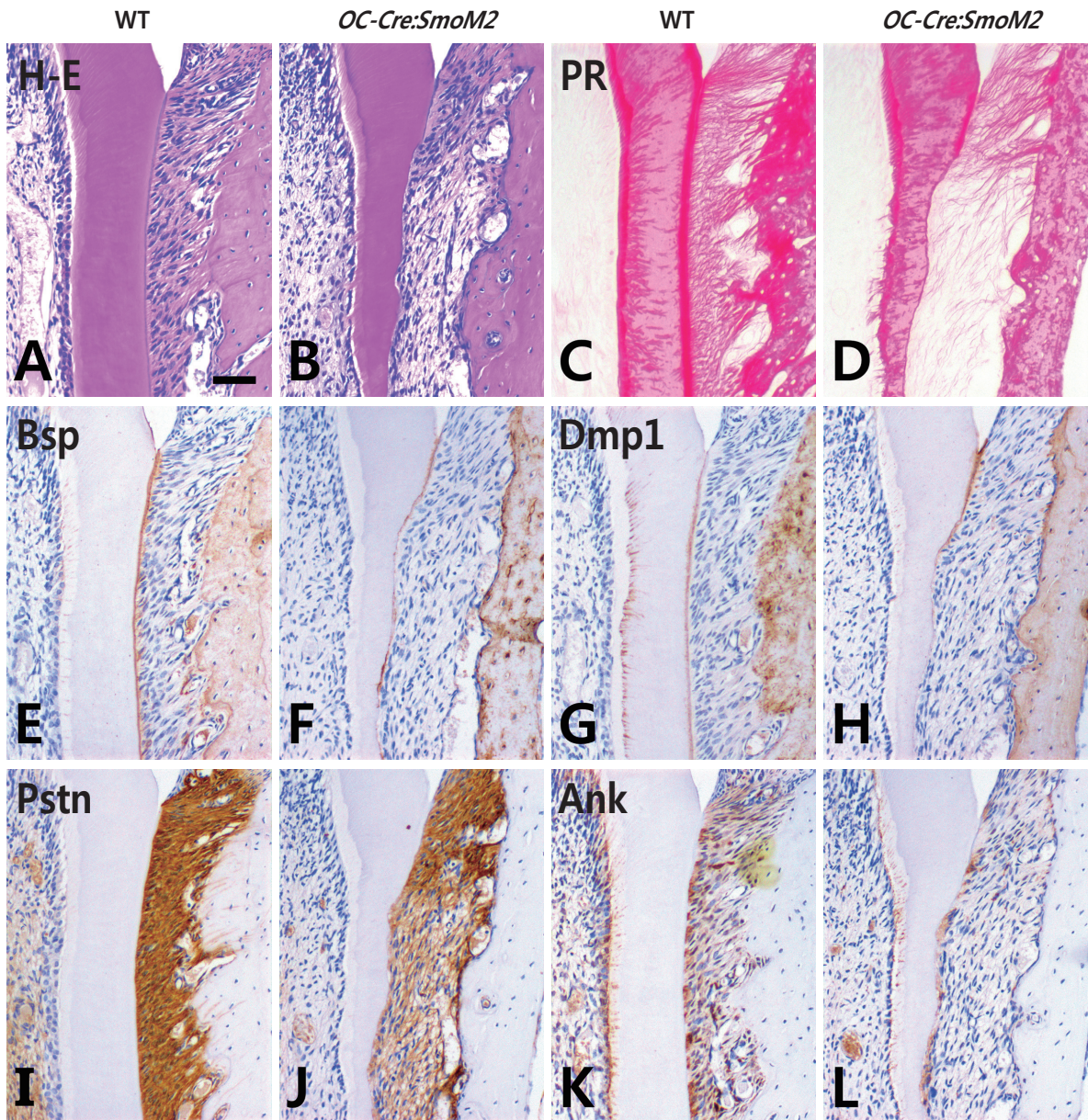


Fig. 6. Molecular changes in the root dentin and periodontium of WT and *OC-Cre:SmoM2* MT at P28. (A, B) In the cervical thirds of the roots in the mandibular first molar, dentin and cementum formation is severely disturbed in MT mouse. (C, D) In Picosirius red-stained sections, differentiation of periodontal ligament fiber is also affected and loosely arranged fibers in MT mouse. (E - H) Bsp and Dmp1 marked cementum in WT mouse, but discontinuity of Bsp and Dmp1 is observed in cementum of MT mouse. (I, J) Pstn is specifically localized in the periodontal ligaments of WT mouse, which is decreased in the periodontal ligament fibers of MT mouse. (K, L) Ank is decreased in the cementoblast of MT mouse (Scale bar = 50 μ m).

56일경 생쥐의 치근 apical 부위를 H-E 염색하여 관찰한 결과 WT mouse에서는 세포성 백악질의 형성이 치근의 성장완료 이후에도 지속적으로 점점 증가하는 것이 관찰되었으나(Fig. 7A - 7C), MT mouse에서는 세포성 백악질의 형성이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 7D - 7F).

3. 치성간엽 특이적 Smo 차단(specific inactivation) 모델의 치근 및 치주 표현형과 조직학적 분석

생후 28일된 WT mouse와 Smo 차단 MT mouse의 형태이상 및 광화이상 유무를 확인하기 위해 Micro-CT촬영 후 영상 분석을 시행하였고, 조직학적 분석을 위해 구치를 절단한 표본을 H-E 염색하여 고배율로 치근을 관찰하였다. Smo가 치성간엽 특이적으로 차단되었을 때, Smo 활성화모델과 다르게 WT mouse와는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 치근형성이 완료된 이후에도 치근 및 치주조직은 전체적인 외형과 상아질, 백악질, 뼈 등의 경조직 형성, 치주인대의 밀도 및 주행에서 유의미한 발생학적 차이가 보이지 않았다(Fig. 8A - 8H).

IV. 총괄 및 고찰

구강상피가 치성간엽조직으로 함입되면서 시작되는 초기 치아발생과정에서 상피와 간엽의 상호작용이 중요하며, 이러한 상호작용이 차단되었을 때 치아의 발생이 중단됨이 보고되었다 [11,12]. 최근 연구에 따르면 치아 경조직 및 치주조직의 형성과정에서도 이러한 상호작용이 중요하다고 알려져 있으며, 대표적으로 HERS로부터 전해지는 상피성 신호전달이 이러한 상호작용에서 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다[13-15]. HERS가 치근이 형성되는 동안 인접한 상아모세포의 분화조절을 통해 치근 형성을 조절한다고 알려져 있지만, 인접한 백악모세포와 백악질의 형성 및 조절에 어떠한 영향을 주고 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다[16].

본 연구는 치아발생과정에서 SHH signaling 관련인자들의 독특한 발현 양상과 역할에 대한 선행연구들을 근거로 하여 HERS로부터 유래한 Shh가 인접 간엽세포(상아모세포, 백악모세포, 치주인대세포)의 분화 및 기능을 조절한다는 가설을 설정하였다[3,4,17]. 이를 위해 SHH signaling의 세포내 신호전달 물질인

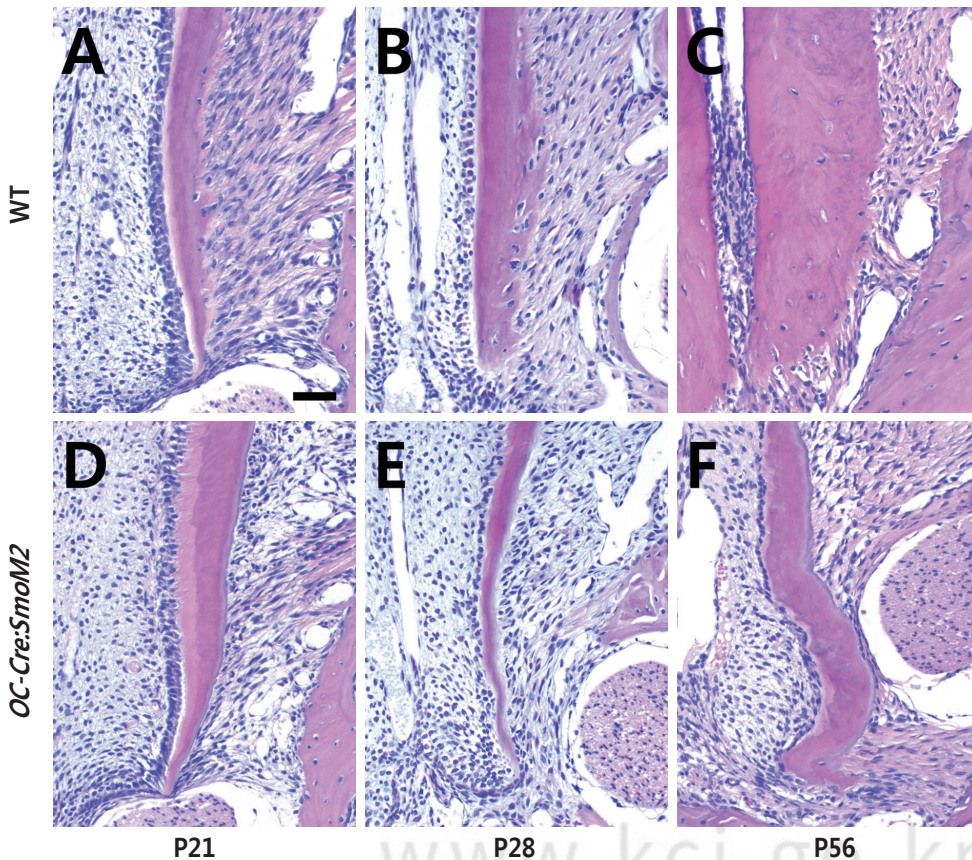


Fig. 7. H-E stained sections of the mandibular first molar from WT and *OC-Cre:SmoM2* MT at P21, 28, 56. (A - F) In the WT mouse, cellular cementum thickness gradually increased with age. However, no cellular cementum was observed in the apical thirds of the roots of MT mouse (Scale bar = 50 μ m).

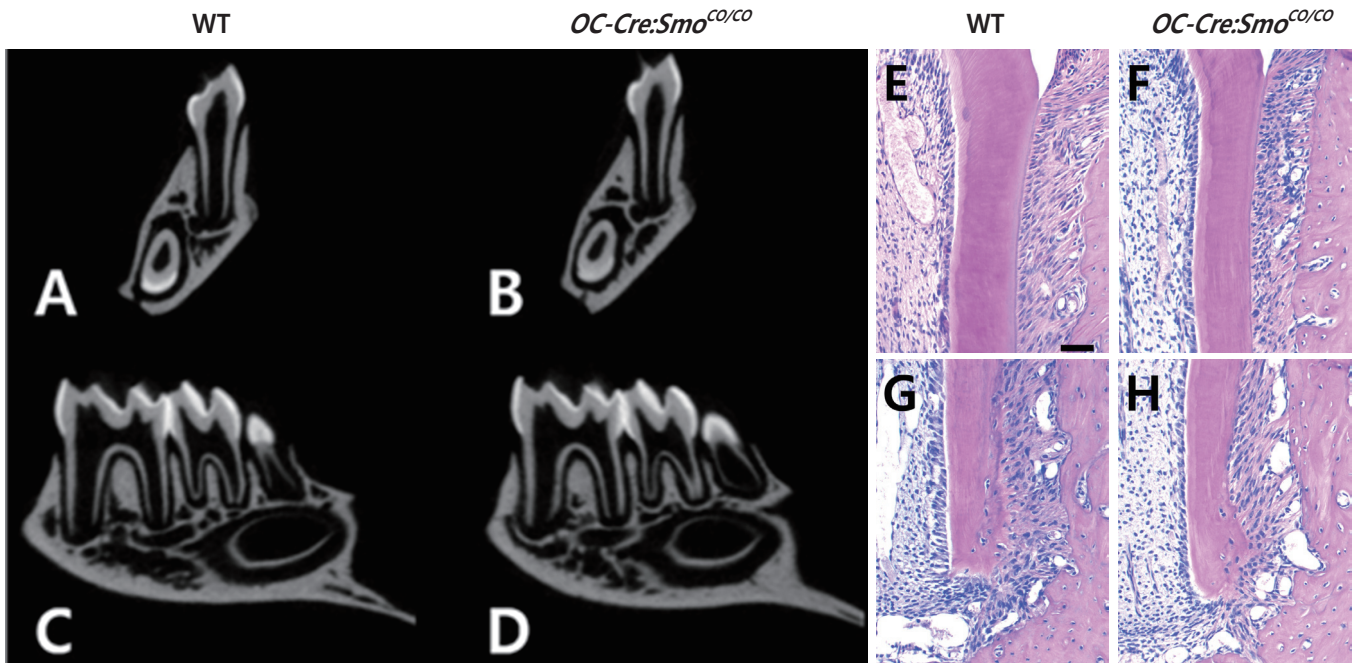


Fig. 8. Radiological and histological features of WT and *OC-Cre:Smo^{co/co}* MT at P28. Micro-tomographic features (A - D) and histological features (E - H) of the mandibular first molar of *OC-Cre:Smo^{co/co}* show normally formed tooth and its surrounding tissues including dentin, cementum and bone (Scale bar = 50 μ m).

Smo를 치성 간엽세포에서 특이적으로 유전자 적중하였으며, 이를 통해 치성 간엽세포에서 SHH signaling이 활성화 및 차단된 상태에서 치아 및 치아주위조직의 형성이 변화되는지를 살펴본 바 있다[8-10].

Smo 활성화 모델에서 발견되는 치근길이성장의 저하와 치근 상아질 형성의 저하는 HERS 유래의 SHH signaling이 치근 상아모세포의 분화를 조절한다는 Huang 등[4]의 연구결과를 지지한다. 그러나 본 연구에서 Smo 차단모델은 상아모세포의 분화와 상아질 형성에서 어떠한 변화도 보이지 않았다. 이러한 결과는 SHH signaling의 억제성 전사인자로 작용하는 Gli3가 치근단 주변에서 많이 발현되며 활성화 전사인자로 작용하는 Gli2가 치근단에서 적게 발현되고 있다는 Khan 등[3]의 연구결과와 함께 고려하였을 때, 상아모세포의 적절한 분화 및 상아질 형성에는 적절하게 낮은 수준의 SHH signaling이 요구된다는 의미로 생각된다. 향후 어떠한 조절기전에 의하여 SHH signaling이 적절한 수준으로 유지 될 것인지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Smo 활성화모델에서는 치근 일부의 흡수 양상 및 세포성 백악질 형성 저하 등의 표현형이 관찰되었으나, Smo 차단모델에서는 정상 백악질의 표현형이 관찰되었다. 이러한 결과는 Shh가

BMP signaling을 통해 백악모세포의 분화를 촉진한다는 Bae 등 [18]의 연구결과와 동일하게 백악모세포의 분화 및 백악질 형성에 있어 SHH signaling이 낮은 수준으로 조절되어야 함을 의미하고 있다. 백악질의 형성 저하 및 이에 따른 치근 흡수양상은 WNT signaling 저하모델에서도 관찰되는데, 백악질의 형성과 관련 있는 다양한 신호전달과정 및 이들 간의 상호 조절기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다[19].

본 연구의 치성 간엽세포에서 Smo를 유전자 적중하기 위해 사용한 Osteocalcin-Cre는 일부 치주인대 섬유에도 작용하지만, 이를 이용한 Smo 활성화모델에서 보이는 치주인대의 극적인 형성감소가 치주인대세포에서의 SHH signaling 활성화에 따른 직접적인 결과인지에 대해서는 명확한 결론을 내리기 어렵다[20,21]. 치주인대의 양 극단은 백악질과 뼈에 각각 매입되어 치아와 치조골을 연결하는데, Smo 활성화모델에서 보이는 백악질의 형성저하가 치주인대의 결함을 이차적으로 유발하였을 가능성이 있기 때문이다. 다만 SHH signaling이 치주인대세포주의 증식에 기능한다는 Martinez 등[22]의 연구와 백악질의 형성이 온전하지 않은 발생 중인 치근에서 치주인대의 밀도 감소가 관찰된 본 연구의 결과에 따르면 치주인대세포의 분화 및 기능 시 낮은 수준으로 조절되는 SHH signaling이 필요하다고 볼 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구는 치근 및 치주조직 형성과정동안 SHH signaling의 역할을 알아보기 위하여 SHH signaling의 세포 내 신호전달경로의 중심 매개체로 알려져 있는 Smo를 Cre-LoxP system을 이용하여 특정 조건하에서만 유전자적중이 일어나는 conditional knockout mouse와 교배하여 조직특이적으로 SHH signaling이 활성화 또는 차단되도록 하였다.

생후 28일경 생쥐의 면역조직화학염색 시 SHH signaling을 활성화하였을 때, 치조골과 백악질의 표식자인 Bsp와 Dmp1, 치주인대의 표식자인 Pstn, 백악모세포 표식자인 Ank의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 Smo를 차단하였을 때 WT mice와 비교하여 이러한 기질 단백질들의 발현에 차이가 보이지 않았다. 본 연구를 통하여 치근 및 치주조직의 정상적인 형성과정에 낮은 수준으로 조절되는 SHH signaling이 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.

References

- Cohen MM Jr : The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet*, 123:5-28, 2003.
- Ingham PW, McMahon AP : Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Gene Dev*, 15:3059-3087, 2001.
- Khan M, Seppala M, Cobourne MT, et al. : Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns*, 7:239-243, 2007.
- Huang XF, Xu X, Chai Y, et al. : Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial- mesenchymal interaction is crucial in regulationg tooth root development. *J Bone Miner Res*, 25:1167-1178, 2010.
- Nakatomi M, Morita I, Ota MS, et al. : Sonic Hedgehog signaling is important in tooth root development. *J Dent Res*, 85:427-431, 2006.
- Kim TH, Bae CH, Cho ES, et al. : Nfic regulates tooth root patterning and growth. *Anat Cell Biol*, 48:188-194, 2015.
- Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP : Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell*, 105:781-792, 2001.
- Jeong J, Mao J, McMahon AP, et al. : Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev*, 18:937-951, 2004.
- Long F, Zhang XM, McMahon AP, et al. : Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*, 128:5099-5108, 2001.
- Tan X, Weng T, Yang X, et al. : Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis. *J Cell Sci*, 120:2162-2170, 2007.
- Hardcastle Z, Mo R, Sharpe PT, et al. : The SHH signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*, 125:2803-2811, 1998.
- Thesleff I : The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet*, 140:2530-2535, 2006.
- Slavkin HC, Boyde A : Cementum: an epithelial secretory product? (abstract). *J Dent Res*, 53:157, 1975.
- Hammarstrom L : Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24:658-668, 1997.
- Aukhil I, Nishimura K, Fernyhough W : Experimental regeneration of the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1:101-115, 1990.
- Huang X, Bringas P Jr, Chai Y, et al. : Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol*, 334:22-30, 2009.
- Gritli-Linde A, Bei M, McMahon AP, et al. : Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*, 129:5323-5337, 2002.
- Bae WJ, Auh QS, Lim HC, et al. : Sonic Hedgehog Promotes Cementoblastic Differentiation via Activating the BMP Pathways. *Calcif Tissue Int*, 99:396-407, 2016.
- Lim WH, Liu B, Cheng D, et al. : Down regulation of Wnt causes root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 146:337-45, 2014.
- Kim TH, Lee JY, Cho ES, et al. : Constitutive stabilization of β -catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 412:549-555, 2011.
- Kim TH, Bae CH, Cho ES, et al. : β -catenin is required in odontoblasts for tooth root formation. *J Dent Res*, 92:215-221, 2013.
- Martinez C, Smith PC, Palma V, et al. : Sonic Hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells. *J Dent Res*, 90:483-488, 2011.

국문초록

치근 및 치주조직 형성과정 동안 Sonic Hedgehog signaling의 역할

황재원¹ · 조의식¹ · 양연미²

¹전북대학교 치과대학 구강해부조직학교실 및 구강생체과학연구소

²전북대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강생체과학연구소

본 연구는 치근 및 치주조직의 형성과정동안 Sonic Hedgehog (SHH) signaling의 역할에 대해 알아보하고자 치성간엽에서 조직특이적으로 Smoothened (Smo)가 활성화 또는 차단되는 mouse를 제작하여 분석하였다. 생후 28일경 Smo 활성화모델에서는 H-E 염색 시 얇은 두께의 치근상아질, 넓어진 치수강, 치주인대공간에 느슨하게 배열되어있는 섬유들이 관찰되었다. 면역조직화학염색 시 Smo 활성화모델은 wild type mouse와 비교하여 백악질, 치주인대 그리고/또는 백악모세포의 표식자인 Bsp, Dmp1, Periostin, Ank 같은 기질 단백질들의 발현이 현저히 감소하였다. 그러나 Smo 차단모델은 wild type mouse와 비교하여 이러한 기질 단백질들의 발현에 차이가 보이지 않았다.

본 연구를 통하여 치근 및 치주조직의 정상적인 형성과정에 낮은 수준으로 조절되는 SHH signaling이 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.