

3

JD005 화합물이 인간치수유래줄기세포의 상아질 모세포 분화에 미치는 영향에 관한 연구

¹부산대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실, 치의생명과학연구소

²제이디바이오사이언스, 기업부설연구소, ³광주과학기술원, 화학과

⁴전북대학교 치과대학 약리학교실

김다솔^{1#}, 이남걸^{2#}, 장혜옥^{1*}, 안진희^{3*}, 김형룡^{4*}

#Da-Sol Kim and Nam-Geol Lee were contributed equally to this work.

간추린 제목: JD005화합물의 상아질 모세포 분화에 미치는 효과

ORCID ID

Da-Sol Kim,  <https://orcid.org/0000-0003-3406-235X>

Nam-Geol Lee,  <https://orcid.org/0000-0001-9489-0312>

Hye-Ock Jang,  <https://orcid.org/0000-0002-9680-4446>

Jin-Hee Ahn,  <https://orcid.org/0000-0002-6957-6062>

Hyung-Ryong Kim,  <https://orcid.org/0000-0002-6710-6964>

ABSTRACT

The effect of JD005 compound on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells

¹Dental Pharmacology, School of Dentistry, Pusan National University

²Research and Development Center, JD Bioscience

³Department of Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology

⁴Department of Pharmacology, College of Dentistry, Jeonbuk National University

Da-Sol Kim^{1#}, Nam-Geol Lee^{2#}, Hye-Ock Jang^{1*}, Jin-Hee Ahn^{3*}, Hyung-Ryong Kim^{4*}

Preservation of natural teeth and their structure is critical for chewing, swallowing, and better speech. Dentin and dental tissues are crucial in maintaining natural teeth and their structure, but treatment of dental tissue and dentin fracture is challenging for dentistry. Hence, scientific understanding needs to be translated to discover novel dental treatments. Dental pulp stem cells (DPSCs) are mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the third molar pulp. These cells have similar characteristics to MSCs with a unique property where DPSCs can differentiate into dentin forming odontoblast-like cells. Here, we made an effort to evaluate the potential substrate that induces odontoblastic differentiation of DPSCs. In this study, JD005, a modified A2A antagonist from ZM-241385, was determined to enhance OD. Specifically, JD005 treatment significantly enhanced the OD markers like alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), OPN, dentin sialophosphoprotein (DSPP), and dentin matrix protein 1 (DMP1). Additionally, the DPSCs treated with JD005 showed enhanced SMAD phosphorylation associated with differentiation. These observations distinctively suggest that JD005 potentially contributes to dentin regeneration via odontoblast differentiation.

Key words : DPSCs, JD005, dentine regeneration, odontoblasts, RUNX2, DSPP, SMAD phosphorylation.

ACKNOWLEDGEMENT This work was supported by Bio & Medical Technology Development Program NRF-2017M3A9E4047243), the Ministry of Science, ICT and Future Planning, Republic of Korea.

*Corresponding Author

Hyung-Ryong Kim, DDS, PhD, Professor

Department of Pharmacology, College of Dentistry, Jeonbuk National University, Jeonju, 54896, Republic of Korea.

Tel : +82-63-270-4024 / Fax : +82-63-270-4024 / E-mail : hrkimdp@gmail.com

Jin-Hee Ahn, PhD, Professor

Department of Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology, 123, Cheomdangwagi-ro, Buk-gu, Gwangju, 61005, Republic of Korea.

Tel : 82-62-715-4621 / Fax : 82-62-715-3609 / E-mail : jhahn@gist.ac.kr

Hye-Ock Jang, KMD, PhD, Professor

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Pusan National University, 49, Busandeahak-ro, Yangsan, 50612, Republic of Korea

Tel : 82-51-510-8236 / Fax : 82-51-510-8233 / E-mail : jho9612@pusan.ac.kr

I. INTRODUCTION

성체줄기세포(adult stem cell)^{1~4)}는 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 구별되는 줄기세포로서⁵⁾, 일정한 세포로만 분화 가능한 다중분화능(multipotent)한 성질을 지니고 있다^{2,6)}. 특히 치아줄기세포의 경우 외배엽성중배엽 세포로 다른 조직에 비하여 용이하게 조직에 접근하여 줄기세포를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 치아에서 분리할 수 있는 줄기세포로는 치수에서 분리 가능한 치수유래줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)⁷⁾, 유치줄기세포(stem cell from human exfoliated deciduous teeth, SHED)⁸⁾, 치근유두줄기세포(stem cells from the apical part of the papilla, SCAP)⁹⁾, 치아주머니줄기세포(stem cells from the dental follicle, DFPC), 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cells, PDLSC)¹⁰⁾ 등이 있다.

치아재생의 효과를 촉진시키기 위한 참고하여 사용한 화합물은 ZM241385며, 이와 같은 화합물의 adenosine A2A receptor antagonist는 알츠하이머, 파킨슨병 치료 뿐만 아니라 해마 등의 회복에 효과가 있으며¹¹⁾, 골재생 촉진과 관련하여 연구된 결과가 있었고, 기존에 알려진 이를 바탕으로 치아재생에 접목시키고자 하였다¹¹⁾. 그리하여 본 실험에서 사용한 화합물은 JD005는 ZM241385의 aminoethyl-4-phenol 작용기를 aminomethyl-

4-phenol 작용기로 도입한 화합물이다.

본 연구에서는 위에 설명한 화합물을 이용하여 치수유래줄기세포에서 치아모세포 분화를 유도¹²⁾하였을 때 분화 촉진 효과가 나타나는지 확인하는 실험을 진행하였다. 화합물의 세포 독성을 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 실시하였으며, 상아질 모세포의 유도를 촉진하여 Alizarin Red S staining을 통한 염색으로 분화 시 유도되는 석회화를 확인하였고, 상아질 모세포의 분화 마커로 알려진 마커 유전자의 발현을 real-time PCR로 확인을 하였으며, western blot을 통하여 마커 단백질의 발현을 확인하였다. 이 뿐 아니라 상아질 모세포 분화에 관여하는 여러 세포 신호 전달 경로중 BMP/SMAD signaling이 관여한다는 여러 연구 결과에 따라^{1,13)} SMAD 1/5/8의 phosphorylation의 증가를 확인하여 본 신호전달경로를 통하여 분화가 촉진됨을 확인하였다.

II. MATERIALS and METHODS

1. 치수줄기세포배양

치수줄기세포(hDPSCs)는 Lonza(PT-5012, Switzerland)에서 구매하여 사용하였으며, antibiotic-antimycotic (anti-anti, final concentration 1X)가 포함된

xeno-free human MSC medium (StemMACS™ MSC Expansion Media Kit XF, MACS)을 사용하여 5% CO₂, 37 °C incubator 에서 세포를 배양하였다. 세포는 4000 cells/cm² 기준으로 배양하였으며, 3일마다 배지를 교체하였으며 실험에 사용하는 세포는 Passage 3 에서 6 사이의 세포를 사용하였다.

2. 세포생존률 측정

치수줄기세포를 1×10^3 cells/well로 96 well plates 에 seeding을 하였다. 생존률 측정 시 세포 독성을 확인하기 위하여 JD005(화합물)을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO, sigma)에 용해하여농도별로 처리하였고, 3일동안 배양 후 세포생존률을 측정하였다. 세포생존률 측정을 위하여 CCK-8 assay kit (동인바이오텍, 대전)를 사용하였으며, CCK-8 reagent 10 μ L를 100 μ L의 배지에 넣어 주고 37°C 에서 2 시간 동안 incubation 한 뒤, microplate reader (Tecan, Sunrise)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 상아질모세포 분화

48 well plate (SPL, 대전)에 1×10^4 cells/well로 seeding 한 후, well에 세포가 100%로 자라게 되면 분화

를 유도한다. 분화 유도를 위하여 사용한 배지는 antibiotic-antimycotic (anti-anti, final concentration 1X), 10% FBS (GIBCO, 16000), 0.1mM dexamethasone, 10mM β -glycerophosphate, and 50mM ascorbic acid 가 포함된 α -MEM medium (GIBCO)를 사용하였으며¹⁴⁾, 약물 처리와 함께 3일 마다 한 번씩 배지를 교환해주었다. 14일동안 분화를 진행하였으며, Alizarin red S staining (2% Alizarin Red S with a pH of 4.3 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA))을 통하여 분화능을 측정하였다. 염색 된 well은 스캐너로 plate를 스캔 한 후, 현미경을 이용하여 세포 사진을 찍고, 염색약을 잘 말린 뒤 염색의 정량 분석을 위하여 10% (w/v) cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich)이 포함 된 10mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액을 300 μ L씩 well에 넣고 염색약을 추출해 낸 뒤, micro plate reader기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Real-time PCR analysis

상아질 모세포 분화 마커 유전자 발현을 확인하기 위하여 real-time PCR을 진행하였다. 분화 유도 후, 7일째 되는 날 세포를 회수하여 trizol (FavorPrep™ Tri-RNA reagent, 동인바이오)을 이용하여 RNA를 추출하고, cDNA (bioneer, 대전)를 합성하였다. 유전자의 발현은 real-

Table 1. Real-time PCR primer sequences

Gene	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
DSPP	GAA GAT GCT GGC CTG GAT AA	TCT TCT TTC CCA TGG TCC TG
DMP1	ACC TTT GGA GAC GAA GAC AAT GGC	TGT CTT CAC TGG ACT GTG TGG TG
ALP	AGC TGA ACA GGA ACA ACG TGA	CTT CAT GGT GCC CGT GGT C
RUNX2	GGT TAA TCT CCG CAG GTC ACT	CAC TGT GCT GAA GAG GCT GTT
OPN	AGC AGA GCG ACA CCC TAG A	GCT CAT TGC TCT CAT CAT TGG C
β -actin	GGC ACC CAG CAC AAT GAA G	TGC GGT GGA CGA TGG AGG

Table 2. Western Antibody lists

Protein	Catalog Number
DMP-1	SC-73633, Santa cruz biotechnology
DSPP	SC-73632, Santa cruz biotechnology
β -actin	SC-47778, Santa cruz biotechnology
Phospho SMAD- 1/5/8	AB3848-I, Merck Millipore
Total SMAD-1/5	PA5-80036, Thermofisher scientific
goat anti-mouse IgG	ADI-SAB-100
goat anti-rabbit IgG	ADI-SAB-300

time PCR (ABI 7500)을 통하여 실시하였으며, 실험에 사용한 primer sequence는 table 1에 나타내었다¹⁵⁾.

5. Western blot analysis

상아질 모세포 분화 마커 단백질 발현 및 세포신호전달경로를 확인하기 위하여 western blot analysis를 시행 하였다. 1X protease/phosphatase inhibitor가 포함 된 RIPA buffer(Intron)를 사용하여 단백질을 회수하고 30 μ g의 농도로 western blot analysis를 시행하였다. Western blot에 사용한 항체는 Table 2에 나열하였다.

6. 통계처리

본 실험의 결과는 세 번의 독립적인 실험을 수행하여 얻어진 평균값 및 표준편차를 사용하여 나타내었으며, 그룹간의 통계적 차이는 control과 실험군을 비교하여 Student's t-test를 이용하여 분석하고 $P < 0.05$ 이하에서 유의성을 나타내었다. 여기서 사용한 control은 sample과 다른 약물 처리군과 동일한 상태로 만들어 주기 위하여 다른 well과 동일한 양의 0.001%의 DMSO를 처리하였다.

III. RESULTS

1. JD005의 합성

치아유래줄기세포에서 치아모세포 분화를 유도하는 효능이 있는 새로운 화합물을 합성하기 위해 기존에 골재생에 효과를 보인 Focus Bioscience 사의 ZM241385^{16,17)}로부터 유도체화를 진행하여 구조-활성 상관관계를 확인하였다. ZM241385의 aminoethyl-4-phenol 작용기에 변형을 주어 JD002, JD003, JD004, JD005, JD006, JD007 그리고 JD008를 합성하여 치아 분화 효과를 확인하였고, 그 중 aminoethyl-4-phenol 대신 aminomethyl-4-phenol 작용기를 도입한 JD005가 ZM241385보다 높은 활성을 보임을 확인하였다. JD005는 ZM241385로부터 아래 Fig. 1와 같이 합성되었다.

N"-(Furan-2-ylcarbonyl)carbonohydrazonic diamide (1)
2-Furoic hydrazide (894 mg, 7.09 mmol)와 S-methylisothiuronium sulfate (2.37 g, 8.51 mmol)을 섞은 혼합물은 H_2O (12 mL)에 녹인 sodium hydroxide 용액 (567 mg, 14.2 mmol)이 넣고 상온에서 2일동안 교반하였다. 결과로 침전된 물질은 필터 된 후에 diethyl ether로 washing 하였고, 흰색 가루의 생성물을 얻었다 (1.02 g, 수율 85.6%).

5-(Furan-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-amine (2)

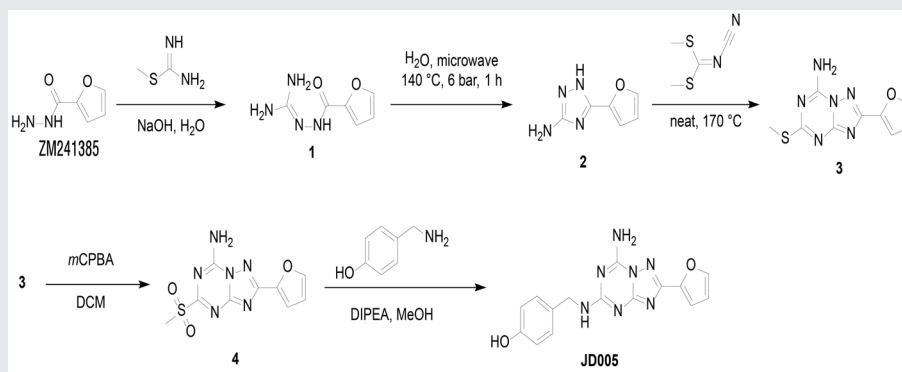


Figure 1. Synthetic scheme for the synthesis of JD005. Synthetic scheme for the synthesis of JD005. 2-Furoic hydrazide was cyclized via two step reactions to afford 2 (yield 85.6%, 89.5% each). Then, 2 was refluxed under neat condition with dimethyl cyanodithioiminocarbonate to afford 3 (yield 21.4%). 3 was oxidized via mCPBA to afford 4 (yield 80.5%). Finally, 4 was substituted with aminomethyl-4-phenol to afford JD005 (yield 17%, purity 98.07% (LC)).

N'' -(Furan-2-ylcarbonyl)carbonohydrazonic diamide (1.02 g, 6.07 mmol) 에 H_2O (20 mL)를 넣은 현탁액은 microwave에서 160 °C, 6 bar 조건으로 1시간동안 교반 하였다. 반응 혼합물은 ethyl acetate로 추출한 후 brine 으로 washing하고 Na_2SO_4 에 의해 건조했다. 그리고 나서 감압농축 하여 베이지 가루의 생성물이 얻었다 (815 mg, 수율 89.5%). 1H -NMR (400 MHz, DMSO- D_6) δ 12.11 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.10 (s, 2H).

2-(Furan-2-yl)-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amine (3)

5-(Furan-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-amine (770 mg, 5.13 mmol)과 S,S'-dimethyl N-cyanodithioimino-carbonate (825 mg, 5.64 mmol) 혼합물은 argon 으로 치환된 대기환경에서 170 °C에 3시간동안 교반 하였다. 반응 혼합물을 상온까지 식히고 methanol (5 mL)과 DCM (5 mL)을 넣었다. 이후 반응 혼합물은 over night

로 환류 시켰다. 결과물은 컬럼크로마토그래피로 정제하여 흰색 고체의 생성물이 얻었다 (273 mg, 수율 21.4%).

2-(Furan-2-yl)-5-(methylsulfonyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amine (4)

2-(Furan-2-yl)-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amine (273 mg, 1.10 mmol)에 DCM (8 mL)을 넣은 현탁액은 0 °C에서 교반되며 m-chloroperoxybenzoic acid (<77%, 759 mg, <3.39 mmol)를 DCM (2 mL)에 녹인 용액이 천천히 넣었다. 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반 하였다. 용매가 감압 조건에서 없어진 후 ethanol이 넣고 생성된 고체는 필터 된 후에 ethanol로 씻어졌고, 상아색 가루의 생성물이 얻었다 (248 mg, 수율 80.5%).

4-(((7-Amino-2-(furan-2-yl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5-yl)amino)methyl)phenol (JD005)

2-(Furan-2-yl)-5-(methylsulfonyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amine (50 mg, 0.18

mmol)에 MeOH (1 mL)을 넣은 혼합액에 DIPEA (0.16 mL, 0.89 mmol)와 4-hydroxybenzylamine (26 mg, 0.21 mmol)이 넣고, 반응 혼합물은 상온에서 밤새 교반 하였다. 이후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 흰색 고체의 생성물을 얻었다 (10 mg, 수율 17%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 9.20 (s, 1H), 7.82 (t, 2H), 7.11 (d, 2H), 7.01 (t, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.63 (m, 1H), 4.34 (d, 2H). MS $[\text{M}+\text{H}]^+=324.1$. 순도 (18) 98.07%.

2. JD005가 치수줄기세포 성장에 미치는 세포독성 및 상아질 모세포 분화에 미치는 영향

본 연구를 위하여 합성된 JD005가 치수유래중간엽 줄기세포의 상아질 모세포 분화 기간 동안 미치는 영향에 대한 실험을 진행하였다. 세포의 분화를 진행하기에 앞서 본 화합물이 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 실시 하였다.

그 결과 본 화합물 100 μM 의 농도가 되었을 때, 약 10%

의 세포생존률 감소를 보였지만, 이는 매우 낮은 비율이므로 본 농도를 이용하여 세포 분화를 유도가 가능하다는 것을 나타내었으며 세포생존률 실험에 이용한 1, 10, 100 μM 농도를 사용하여 분화 실험을 진행 하였다. 그 결과 화합물의 농도에 따라 상아질 모세포 분화가 증가하는 것을 알 수 있었으며, well plate의 이미지와 염색된 세포의 사진 그리고 정량 결과를 그래프로 나타내었다 (Fig. 2A, B, C). 본 연구의 결과로 JD005화합물은 세포 독성은 높지 않으면서도 농도가 증가 할수록 치수줄기세포의 상아질 모세포 분화를 촉진 시키는 것을 보여주었다.

위의 실험 결과로 화합물이 치수줄기세포에 독성과 상아질 모세포 분화 촉진의 효과가 있음을 확인 하였으며, JD005가 상아질 모세포 분화를 촉진하는 것을 증명 하기 위하여 추가로 분화 마커 발현 실험 및 세포 신호전달 경로에 대한 실험을 진행하였다.

본 연구를 위하여 분화 기간 동안 화합물을 처리 하였으며, 화합물을 농도 별로 처리 한 세포에서 상아질 모세포 분화 마커 유전자와 단백질 발현을 확인하였다. 그 결

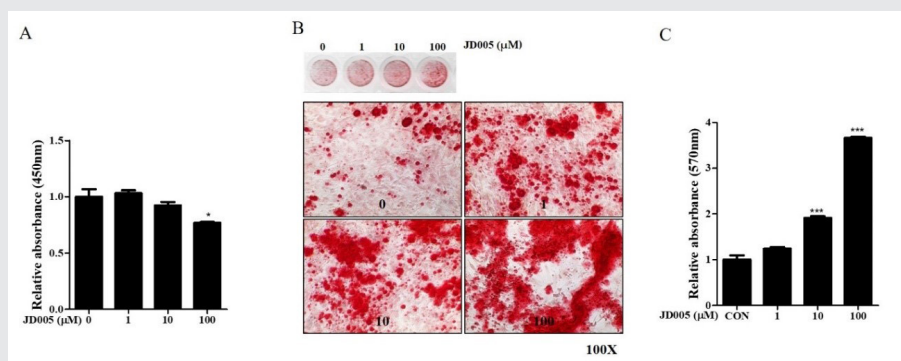


Figure 2. The effect of JD005 on odontoblastic differentiation (1) of dental pulp stem cells (DPSCs). (A) A cell proliferation assay (CCK-8) was performed in the indicated concentrations of JD005-treated cells (n=3). (B) Alizarin Red S staining of odontoblasts. Representative image showing differentiated odontoblast cells (C) Quantitation of Alizarin Red S staining (n=3).

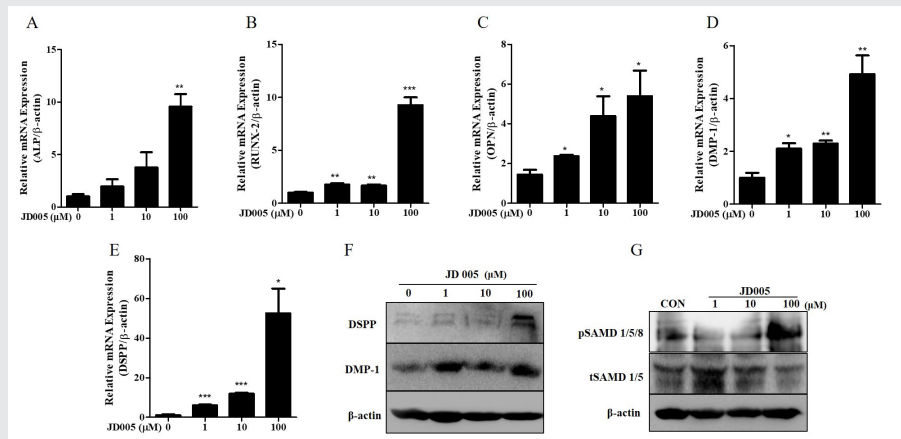


Figure 3. Effect of JD005 on odontoblastic differentiation (OD) markers. (A-E) mRNA expression of various OD markers (n=3). (F) Immunoblotting using antibodies against DSPP and DMP-1. (G) Immunoblotting using antibodies against pSMAD and tSMAD (n=3).

과, 화합물의 농도 증가에 따라 alkaline phosphatase (ALP), RUNX 및 OPN을 포함한 osteoblast 및 상아질 모세포 분화 마커 유전자의 증가를 real-time PCR을 통하여 확인 할 수 있었으며 (Figure 3A-C), 상아질 모세포의 마커로 사용된 DMP-1과 DSPP의 mRNA 및 단백질의 발현 또한 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3D-F). 이는 화합물이 상아질 모세포로의 분화에 있어서 석회화의 증가뿐만 아니라 유전자 및 단백질 발현을 증가 시켰다. 또한, 상아질 모세포 분화 시 관련된 세포신호전달경로를 확인 하였으며, 이를 위하여 SMAD 1/5/8의 phosphorylation의 발현을 측정하였다. 그 결과 SMAD 1/5/8의 phosphorylation이 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3G). 본 화합물이 SMAD 1/5/8의 phosphorylation을 통한 상아질 모세포 분화 기전을 가지고 있음을 시사해 주고 있다.

IV. DISCUSSION

본 연구에서는 치수에서 얻은 중간엽 줄기세포를 사용한 치수줄기세포를 이용하여 치아재생후모물질 JD005의 유효성을 평가하였다. 본 화합물은, 치수유래 중간엽 줄기세포의 상아질 모세포분화 촉진을 유도할 것으로 생각되었다. 본 연구에 사용한 참고하여 화합물로 사용된 Focus Bioscience사의 ZM241385는 기존에 골재생 및 치아재생에 효과가 있었음을 시사하였으며^{16,17}. 이에 참고하여 약물, ZM241385에서 변형 합성된 JD005약물에 대하여 치수유래 중간엽 줄기세포의 상아질 모세포 분화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 본 분화를 촉진하는 작용을 보였으며 상아질 모세포 분화 마커 유전자 및 단백질의 발현 역시 화합물의 농도에 따라 증가함을 보여주었다. 또한 SMAD signaling pathway를 통하여 치수유래 중간엽 줄기세포의 분화가 촉진됨을 시사하였다.

본 연구의 결과로 본 JD005화합물은 세포 독성은 높지 않으면서도 농도의존적으로 치수줄기세포의 상아질 모세포 분화 또한 촉진 시키는 것을 알 수 있다 (Fig. 2A-C). 많은 연구에서 치아 조직의 줄기 또는 전구 세포는 얻기 쉽고, 시험관 내에서 확장될 수 있으며, 놀라운 가소성을 보인다고 보고되어 있으며¹⁹⁾, 본 연구에서 분리된 사람 치수줄기세포 역시 상아질 모세포 유사 세포로의 분화능을 잘 보여주고 있다. 본 연구에서 JD005의 분화과정에서의 유전자발현증가를 제시하면서 SMAD 신호전달기전을 보여주었다. ALP는 알칼리 환경에서 monophosphate ester의 가수분해를 촉매하는 phosphotadyl inositol 연결 막 당단백질로써¹⁸⁾ 이는 osteoblast 및 상아질 모세포 분화의 생화학적 마커로 널리 사용되어 왔으며 bone 석회화에 중요한것으로 알려져 있다. ALP 활성의 상승은 생체 내 치수 세포의 분화 및 치수 세포의 상아질 모세포 분화에 필수적인 마커이다²⁰⁾. 이와 관련하여 ALP 및 연관 유전자인 RUNX2와 OPN의 RNA를 확인하였으며 (Fig. 3A, B, C), 본 화합물로 인한 증가는 JD005가 조골 세포 및 상아질 모세포 분화에 기여함을 알 수 있었다. 또한 JD005에 의하여 total Smad의 양은 변화가 없지만 Smad (Smad1, 5, 8) 인산화가 증가하는 것을 확인하였으며 이는 Co-mad(Smad4)와 함께 복합체가 형성되고 여러 핵 보조인자와 함께 분화 표적 유전자의 전사를 조절하는 핵으로 이동할 것임을 유추하여 볼 수 있다.

JD005가 상아질 모세포 특이적 분자의 발현에 영향을 미치는지 조사하였고 DSP와 DMP-1의 발현이 JD005에 의해 농도 의존적으로 유도됨을 발견하였다 (Fig. 3D, E, F). DSP는 상아질 시알로인단백질(Dentin sialophos-

phoprotein, DSPP) 유전자로부터 전사되는 비콜라겐성 상아질 기질 단백질로 상아질 모세포 특이 단백질로 알려져 있다²¹⁾. DMP-1은 석회화된 조직에서 발현되는 비콜라겐성 단백질이다²²⁾. 다양한 증거에 따르면 DSP는 상아질 모세포 분화의 초기 단계에서 유도되는 반면 DMP-1은 후기 단계에서 유도되고 상아질의 미네랄 단계에 단단히 결합된다. JD005처리시에 DMP-1과 DSP mRNA와 단백질발현이 증가하는 결과는 Smad 신호 전달 경로의 활성화를 통해 상아질 모세포 특성을 유도하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 나타내었다.

치아 발생 과정에서 가장 중요한 점은 다른 상피세포 유래 장기와 마찬가지로 상피-간엽의 상호 작용이 필요하다는 것이다²³⁾. 최근 연구에서 사람의 유치 치수에서 상피세포와 유사한 치수 줄기세포를 발견하였으며^{24,25)}, 자연치아의 보존을 위한 방법의 일환으로 다양한 가능성을 시사해 주고 있다. 고령화 사회로의 진입은 노인 인구에서 자연치아의 보존을 위한 연구^{26,27)}의 필요성이 대두되고 있는 상황에서 골재생에 대한 많은 논란을 가지고 있는 ZM241385 화합물¹⁸⁾에 비해 본 연구에서 사용한 JD005 화합물의 상아질 모세포의 분화능을 보여주고 있으며 치과영역에서 치아재생 및 치아수복등에 적용할 수 있는 기초자료를 제시하였으며, 본 그룹에서 연구한 JD005는 보다 다양한 연구를 통하여 골재생을 정밀하게 분석하며 더 나아가 in vivo 실험을 통하여 상아질 재생을 확인해보는 실험을 진행 하여 좀 더 심화된 결과를 도출할 필요가 있다. 이러한 노력은 임상에 적용하기 위한 충분한 연구 결과를 제공해 줄 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Lopez-Gines C, Monleon D, Llena C, Forner L. Dental stem cell signaling pathway activation in response to hydraulic calcium silicate-based endodontic cements: A systematic review of in vitro studies. *Dent Mater*. 2021; 37(4):e256-e268.
2. Adak S, Magdalene D, Deshmukh S, Das D, Jaganathan BG. A review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. *Stem Cell Rev*. 2021;1-20.
3. Zhang Y, Zhang H, Yuan G, Yang G. Effects of transforming growth factor- β 1 on odontoblastic differentiation in dental papilla cells is determined by IPO7 expression level. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;545:105-11.
4. Liang C, Liao L, Tian W. Stem Cell-based Dental Pulp Regeneration: Insights From Signaling Pathways. *Stem Cell Rev*. 2021;1-13.
5. Charitos IA, Ballini A, Cantore S, Boccellino M, Di Domenico M, Bor-sani E, et al. Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues. *Stem Cells Int*. 2021;2021.
6. Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):656-70.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(25):13625-30.
8. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(10):5807-12.
9. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLOS ONE*. 2006;1(1):e79.
10. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
11. D'Alimonte I, Nargi E, Lannutti A, Marchisio M, Pierdomenico L, Costanzo G, et al. Adenosine A1 receptor stimulation enhances osteogenic differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells via WNT signaling. *Stem Cell Res*. 2013;11(1):611-24.
12. Pisciotta A, Bertoni L, Vallarola A, Bertani G, Mecugni D, Carnevale G. Neural crest derived stem cells from dental pulp and tooth-associated stem cells for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2020;15(3):373-81.
13. Wang Y, Yuan S, Sun J, Gong Y, Liu S, Guo R, et al. Inhibitory effect of the TSG-6 on the BMP-4/Smad signaling pathway and odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Biomed Pharmacother*. 2020;128:110266.
14. Kim DS, Lee SY, Lee JH, Bae YC, Jung JS. MicroRNA-103a-3p controls proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *Exp Mol Med*. 2015;47:e172.
15. Ching HS, Luddin N, Rahman IA, Ponnuraj KT. Expression of Odontogenic and Osteogenic Markers in DPSCs and SHED: A Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(1):71-9.
16. Burnstock G. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br J Pharmacol*. 2012;167(2):238-55.
17. Mediero A, Perez Aso M, Wilder T, Cronstein BN (2015) Brief report: methotrexate prevents wear particle-induced inflammatory osteolysis in mice via activation of adenosine A2A receptor. *Arthritis Rheumatol* 67(3):849-855
18. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochimica Polonica*. 2003;50(4):1019-38.
19. Huang G-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
20. Couble M-L, Farges J-C, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif. Tissue Int*. 2000;66(2):129-38.
21. Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, et al. Dual functional roles of dentin matrix protein 1: implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*. 2003;278(19):17500-8.
22. Paduano F, Marrelli M, White LJ, Shakesheff KM, Tatullo M. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydrogel scaffolds derived from decellularized bone extracellular matrix and collagen type I. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148225.
23. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):35-50.
24. Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386(1):135-9.
25. Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(1):161-71.
26. Byun J-J, Jang E-S, Kong D-R, Lee G-J. Analysis of reasons for extracting permanent teeth among Korean adults with oral diseases. *Oral Biol Res* 2021; 45(1): 1-6
27. Yu N-H, Shin A, Ahn S, Song K-b, Choi Y-H. Estimation and change of edentulism among Korean population: Korea National Health and Nutrition Examination Survey in 2007-2018. *Epidemiol Health*. 2021:e2021020.