

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0095295 (43) 공개일자 2014년08월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)	(71) 출원인 단국대학교 산학협력단 경기 용인시 수지구 죽전로 152, 내 (죽전동, 단국대학교) 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)	
(21) 출원번호 10-2013-0008116 (22) 출원일자 2013년01월24일 심사청구일자 2013년01월24일	(72) 발명자 김해원 충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트) 장준혁 인천 연수구 컨벤시아대로130번길 80, 107동 503호 (송도동, 송도푸르지오하버뷰) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 손민	

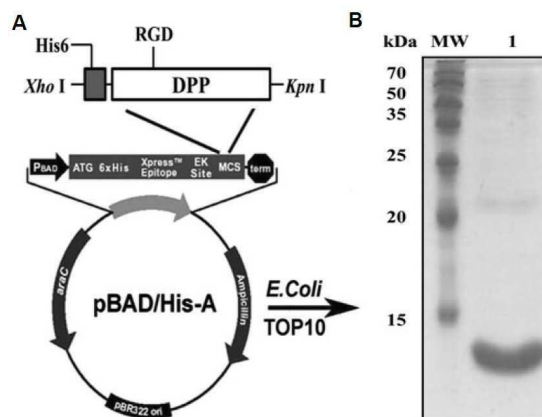
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 상아질 인산단백질을 포함하는 치수 세포의 부착 또는 증식 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)을 유효 성분으로 포함하는 치수 세포(dental pulp cells)의 부착 또는 증식 촉진용 조성물, 및 상기 상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리하는 단계를 포함하는 치수 세포의 부착 또는 증식을 유도하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 발현벡터를 이용하여 대량 생산이 가능해진 재조합 인간 상아질 인산단백질을 이용하여, 치수 세포의 증식이 촉진되고, 세포부착능이 증가하며, 치수 세포에서 상아아세포로의 분화를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 재조합 인간 상아질 인산단백질은 치아 및 골 조직의 회복 및 재생과 관련된 조직 공학적 재료, 치과용 골 재생 치료제 및 의약품 치료제 개발 분야에서 치수 세포의 증식 및 부착을 촉진하는 데에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

윤예랑

부산 해운대구 좌동순환로468번가길 54, 102동 (중동, 동남하이츠맨션)

전은이

인천 남구 석정로351번길 12, 102동 1502호 (주안동, 현대홈타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090093829

부처명 교육과학기술부

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)을 유효 성분으로 포함하는 치수 세포(dental pulp cells)의 부착 또는 증식 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 상아질 인산단백질은 인간 유래인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 상아질 인산단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것인 조성물.

청구항 4

상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 치수 세포의 부착 또는 증식을 유도하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 상아질 인산단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 발현백터를 형질도입시킨 숙주세포에서 재조합 인간 상아질 인산단백질을 발현시키는 단계를 포함하여 제조된 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 발현백터는 도 1에 도시된 개열지도를 갖는 pBAD/His-A 벡터인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 치수 세포는 인간 치수 세포인 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)을 유효 성분으로 포함하는 치수 세포(dental pulp cells)의 부착 또는 증식 촉진용 조성물, 및 상기 상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리하는 단계를 포함하는 치수 세포의 부착 또는 증식을 유도하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 치아는 최외층에 에나멜질, 그 내층에는 상아질이라는 경조직을 가지고 있으며, 상아질 안쪽에 상아질을 생산하는 상아아세포, 더 중심부에는 치수 세포를 가진 기관이다. 치아는 태아기의 발생 과정의 유도에 의해

형성되며, 여러 개의 세포종에 의해 구축된 기능 단위로서, 기관이나 장기와 같다. 따라서, 치아는 성체 내의 조혈 줄기세포나 간엽계 줄기세포와 같은 줄기세포에서 각종 세포종으로 발생하는 줄기세포 시스템에 의해 발생하지는 않는다.

[0003] 이와 같이, 치아는 성체에서는 자발적으로 재생되지 않는 특성을 가지는데 비하여, 인간의 음식 섭취나 언어 생활 등 일상생활에서 지속적으로 외부에 노출되고 사용되는 조직으로, 충치나 치주병 또는 외부적 충격 등에 의해 쉽게 소실될 수 있는 기관이다. 이에, 자발적으로 재생되지 않는 조직의 특징에 따라 최근에는 의치나 임플란트와 같은 방법으로 보충하는 경우가 많다. 그러나, 치아의 유무는 외관이나 음식물의 미각에 크게 영향을 주고, 건강 유지나 질 높은 생활을 위해 치아 조직의 재생 기술의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0004] 최근 분리된 상아아세포 등을 이용하여 치아 조직을 재생하는 방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있는 가운데, J.Dent.Res., 2002, Vol. 81(10), pp. 695-700에서는, 치배에서 단리된 상피계 세포나 간엽계의 치낭 세포 등의 세포를 생체 흡수성 담체와 함께 랫트의 복강 내에 이식함으로써 치아 형태의 조직이 재생되는 것을 보였다. 또한, 일본특개 2004-357567호 공보에는, 생체에서 단리된 상아아세포를, 피브린을 포함한 담체와 함께 배양하여 치아를 형성할 수 있음을 개시하고 있다. 그 밖에도, 상아아세포에서 치아를 형성하는 기술은 여러 기술이 발명되어 있는 상태이다(국제공개 제2005/014070호, 국제공개 제2006/129672호).

[0005] 한편, 상아질 시알로인산단백질(dentin sialophosphoprotein; DSPP)은 비콜라겐성 단백질에 속하는 대표적인 상아질-특이 단백질로, 하나의 유전자로부터 상아질 시알로단백질(dentin sialoprotein; DSP)과 상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein; DPP)의 두 가지 단백질을 합성한다. 상아아세포-특이 유전자로 알려진 DSPP는 골모세포의 오스테릭스와는 달리 상아질의 광화 과정에는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 치수 세포의 분화를 조절하거나 유도하는 인자인지에 관해서는 아직 논란이 있다.

[0006] 상아질 인산단백질(DPP)은 상기 상아질 시알로인산단백질(DSPP)이 잘려 생성되는 카르복시 말단 부분을 말한다. 치아 조직과 관련하여 DPP에 대해서는, 중간엽세포나 조골전구세포주에 처리할 경우 치아모세포로의 분화를 촉진한다는 것(Jadlowiec J et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53323-30)과 인간 치수 세포의 이동 및 상아질 형성에 기능하는 것이 알려져 있다(Yasuda Y et al., J Endod. 2008 May;34(5):575-8). 그러나, DSPP에 비하여 DPP에 대한 치아 조직 재생 관련 연구는 아직 미비한 상태이다.

[0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 DSPP에 비하여 아미노산 서열의 길이가 작아 생산, 분리 및 정제에 용이한 DPP를 재조합 발현 벡터를 이용하여 생산, 분리하여 DPP가 치수 세포의 부착, 증식 및 분화를 촉진한다는 사실을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)을 유효 성분으로 포함하는 치수 세포(dental pulp cells)의 부착 또는 증식 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 치수 세포의 부착 또는 증식을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)을 유효 성분으로 포함하는 치수 세포(dental pulp cells)의 부착 또는 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

- [0011] 본 발명의 용어 "상아질(dentin)"은 외중간엽 기원으로 교원질을 함유하고 있는 석회화 조직으로, 치아의 대부분을 구성하고 있는 흰색의 단단한 조직이다. 치질이라고도 하며, 치관부에서는 에나멜질, 치근부에서는 시멘트질로 덮여있어 치아의 표면으로는 드러나지 않으나, 나이가 많아짐에 따라 에나멜질이 마멸되면 치관의 선단부나 교합면에 상아질이 노출된다. 상아질은 일종의 골조직이지만 보통의 뼈와 다르게, 상아질을 만들고 있는 세포의 본체는 치수 속에 존재하고 그 돌기만 상아질 속으로 뻗어나와 있다.
- [0012] 본 발명의 용어 "상아질 인산단백질(dentin phosphoprotein)"은 치아 조직에서 발견되는 단백질로, 상아질 시알로인산단백질(dentin sialophosphoprotein)이 잘려질 때에 카르복실 말단 부분을 포함하는 단편을 의미하며, 아미노 말단 부분을 포함하는 단편은 상아질 시알로단백질(dentin sialoprotein)이라 한다.
- [0013] 본 발명에서 상아질 인산단백질은 유래에 제한되지 않으나, 바람직하게는 인간 유래의 상아질 인산단백질이며, 더 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 상아질 인산단백질이다.
- [0014] 본 발명의 용어 "치수(dental pulp)"는 치아 내부에 있는 치수강을 채우고 있는 부드러운 결합조직으로 신경과 혈관이 풍부하게 분포해 있다. 치수의 신경은 치수의 최외층에서 치아의 상아질 내면에 접해 있는 상아아세포에서 신경총을 이루고, 그 가지가 상아질의 표층에까지 이른다. 상기 치수를 이루고 있는 본 발명의 "치수 세포(dental pulp cells)"는 분화과정을 거쳐 상아질을 이루는 상아아세포(odontoblast)로 분화하여 상아질을 형성한다. 그 유래에 제한되지 않으나, 바람직하게는 인간 치수 세포일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 용어 "상아아세포(odontoblast)"는 상아질의 내에나멜세포에 접해있는 치유두의 표면에 존재하며, 상아아세포가 전상아질을 만들고, 이에 석회질이 침착하여 상아질이 만들어진다. 본 발명에서 상아아세포는 상아아세포 뿐 아니라 유사 상아아세포(odontoblast-like cell)을 포함할 수 있다. 상기 유사 상아아세포란 원래 줄기세포나, 전구세포 등에서 상아아세포로 분화하도록 유도한 세포로 상아아세포와 유사한 형질을 가지는 세포를 뜻한다.
- [0016] 본 발명의 용어 "부착"은 세포의 부착을 의미하며, 세포끼리의 부착뿐 아니라 세포가 기질에 부착하는 현상을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서는 세포의 부착능력에 상기 상아질 인산단백질이 미치는 영향을 확인하기 위하여 상아질 인산단백질로 코팅한 플레이트에 치수 세포를 배양한 후 일정 시간 동안 부착되는 정도를 크리스탈 바이올렛 실험(crystal violet assay)으로 측정하였으며, 상아질 인산단백질이 치수 세포의 부착을 촉진하는 것을 확인하였다(실시예 4). 부착능력이 좋아지면, 해당 부위에 세포가 잘 부착하게 되며, 일정 형태의 기질 위에 원하는 형태의 구조로 용이하고 고르게 부착시킬 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 치수 세포를 특정 기질 또는 부위에 부착시키고자 할 때 사용할 수 있으며, 특정 기질 또는 부위에 미리 코팅되거나 또는 치수 세포와 함께 처리될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "증식"은 세포가 같은 성질을 유지하거나 분화하면서 분열함으로써 숫자가 증가하는 것을 의미한다. 본 발명에서 증식은 바람직하게는 치수 세포(dental pulp cell)의 증식일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간 치수 세포(human dental pulp cell, hDPC)의 증식일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 치수 세포의 증식에 상기 상아질 인산단백질이 미치는 영향을 확인하기 위하여 상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리 후 MTT 실험으로 확인하였다(실시예 5 및 도 3). 상아질 인산단백질을 처리하였을 때 치수 세포의 증식이 촉진되는 것을 확인하였다.
- [0019] 따라서, 본 발명의 조성물은 치수 세포의 증식을 촉진시키는데 사용할 수 있으며, 이에 따라 동일한 성질의 치수 세포를 다량으로 얻을 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에서는 상아질 인산단백질이 치수 세포의 상아아세포로의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 치수 세포에 상아질 인산단백질을 처리하여, ALP(alkaline phosphatase) 활성 측정 및 Alizarin Red S 염색을 통해 광화작용(mineralization) 정도를 측정하였다.
- [0021] 먼저, ALP 활성을 확인한 결과, ALP 활성이 0일째에는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 rhDPP를 처리한 실험군 간에 차이가 없었으나, 이후 rhDPP를 처리한 실험군은 대조군에 비해서 7일째에는 약 2.3배, 14일째에는 약 6배의 ALP 활성의 증가를 보였다(도 4).
- [0022] 또한, 치수 세포는 상아아세포로 분화함에 따라 칼슘이 침착되게 되는데 Alizarin Red S 시약은 칼슘을 염색하는 시약으로 해당 시약으로 염색되는 정도를 통해 상아아세포로의 분화정도를 확인하였다. 상아질 인산단백질을 처리하였을 때, 0일째에는 염색되는 세포가 없었으나 7일째 및 14일째에는 염색되는 정도가 확연히 증가하는 것을 확인하였다(실시예 6 및 도 5).

- [0023] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 분화를 확인하기 위한 상아아세포 특유 마커인 Col1(collagenase 1), ALP(alkaline phosphatase specific activity) 및 DMP-1(domain matrix protein-1)의 발현 정도를 mRNA 수준을 역전사 PCR 및 이를 통해 얻은 cDNA를 정량적 실시간 PCR을 통해 측정하였다(실시예 7, 8 및 도 6). 이를 통해 상아질 인산단백질을 처리한 경우에 DMP-1은 차이를 보이지 않았으나, Col1 및 ALP의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.
- [0024] 즉, 본 발명의 상아질 인산단백질은 치수 세포의 부착, 증식 또는 상아아세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 상아질 인산단백질은 재조합 단백질일 수 있다. 기존에 상아질 분화와 관련된 단백질로 알려져 있던 상아질 시알로인산단백질(dentin sialophosphoprotein; DSPP)은 크기가 크고 발현 및 분리, 정제에 어려움이 있었다. 이에 본 발명에서는 치수 세포의 부착, 증식 및 상아아세포로의 분화를 촉진하는 기능을 가지며 서열이 짧게 이루어져 분리 및 정제가 용이하고 수득율이 증가하는 상아질 인산단백질의 DNA를 추출하여 발현벡터에 도입시켰다. 해당 발현벡터를 숙주세포에 형질도입시켜 재조합 단백질을 생산할 수 있다.
- [0026] 상기 조성물은 in vitro에서 치수 세포의 부착 또는 증식을 촉진하는데 사용할 수 있으며, 또는 in vivo에서 치수 세포의 부착 또는 증식을 촉진하는데 사용할 수 있다.
- [0027] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 치수 세포의 부착 또는 증식을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 "상아질 인산단백질을 치수 세포에 처리"하는 것은 직·간접적 방법, in vitro 및 in vivo 방법 등을 제한없이 포함한다. 예를 들어, 시험관 내 분리된 치수 세포에 처리하는 in vitro 처리 방법 및 생체 내 치아 조직에 직접 주입하거나 도포하는 등의 in vivo 처리 방법 등이 있을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 시험관 내 분리된 치수 세포에 상아질 인산단백질을 처리하는 방식으로 수행하였으며, 이를 통해 상아질 인산단백질이 치수 세포의 부착, 증식 및 분화를 촉진한다는 것을 확인하였다.
- [0029] 본 발명에서 치수 세포에 처리하는 상기 상아질 인산단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 발현벡터를 형질도입시킨 숙주세포에서 재조합 인간 상아질 인산단백질을 발현시키는 단계를 포함하여 제조된 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 용어 "발현벡터"란 숙주세포를 형질전환 할 수 있으며 특정 폴리뉴클레오티드를 발현하는 효과를 가지는 DNA 또는 RNA 벡터를 의미한다. 바람직하게, 상기 발현 벡터는 숙주세포 내에서 복제가능한 것을 의미한다. 발현 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포가 될 수 있으며, 전형적으로 바이러스 또는 플라스미드가 될 수 있다. 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 숙주세포 예를 들어, 박테리아, 진균(fungal), 내부기생충(endoparasite), 절지동물(arthropod), 동물 및 식물세포를 포함하는 세포에서 기능하는(즉, 유전자 발현을 지향하는) 모든 벡터를 포함한다. 본 발명의 벡터는 공지기술로 알려진 무세포 발현 시스템에서 폴리펩티드를 생산하는데도 사용될 수 있다. 본 발명에서 발현벡터는 바람직하게는 도 1에 도시된 개열지도도를 갖는 pBAD/His-A벡터일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어 "숙주세포"는 본 발명의 외인성 폴리펩티드로 형질전환될 수 있는 세포를 의미하며, 형질전환된 재조합 세포도 포함할 수 있다. 도입된 발현벡터가 적절하게 발현될 수 있도록 전사인자(transcription factors), 번역인자(translation factors) 또는 후번역인자(post translational factors)등을 포함하는 세포를 뜻한다. 숙주세포는 본 발명의 발현벡터로 형질전환될 수 있는 모든 세포를 포함한다. 본 발명의 숙주세포는 내생적으로 본 발명의 단백질을 생산할 수 있거나 본 발명의 발현벡터로 형질전환 된 후 단백질을 생산할 수 있다. 본 발명의 숙주세포는 본 발명의 단백질을 생산할 수 있는 모든 세포가 될 수 있으며, 박테리아, 진균(효모를 포함), 기생충, 선충류, 절지 동물, 동물 및 식물 세포를 포함한다. 숙주 세포의 예로서 살모넬라(*Salmonella*), 대장균(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*), 리스테리아(*Listeria*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스포돔테라(*Spodoptera*), 마이코박테리아(*Mycobacteria*), 트리코플루시아(*trichoplusia*), BHK(아기 햄스터 신장) 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, CV-1세포, COS(예를 들어, COS-7) 세포, 및 베로(Vero) 세포를 포함한다. 또한, 숙주세포 예로서, E coli K12 유도체를 포함하는 E. coli; 살모넬라 균(*salmonella typhi*); 약독화된 균주를 포함하는 살모넬라 타이피뮤리움(*salmonella typhimurium*); 스포돔테라 프루기페르다(*spodoptera frugiperda*); 트리코프루시아니(*trichoplusia*); 및 비종양형성 마우스 근육모세포 G8 세포(예를 들어, ATCC CRL 1246)를 포함한다. 본 발명에서 숙주세포는 바람직하게는 E.coli 일종인 TOP10 세포일 수 있다. 상기 숙주세포에 외인성 폴리펩티드가 도입된 "재조합 세포"는 도입된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 그들의 직

접적인 자손 세포 또는 간접적인 자손 세포를 포함한다.

[0032] 본 발명에서 상기 발현벡터 등 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주세포로 형질전환하는 것은 폴리뉴클레오티드를 세포 내에 삽입할 수 있는 모든 방법으로 수행될 수 있다. 형질전환 기술은 트랜스펙션, 전기천공법, 미세주입, 리포펙션, 흡착 및 원형질체의 융합을 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 염색체 외에 남아있거나, 그들의 발현되는 능력이 유지되는 방식으로 형질전환된 세포의 염색체 내 하나 이상의 위치에 삽입될 수 있다.

[0033] 본 발명의 용어 "재조합"이란 특정한 천연형 또는 변이형 유전자를 삽입, 치환, 제거하는 등의 인위적 조작을 가하는 행위를 말하며, 본 발명에서 "재조합 인간 상아질 인산단백질"은 인간 상아질 인산단백질을 벡터 안에서 발현가능하도록 삽입시켜 제조한 발현벡터를 숙주세포에 도입시켜 발현하여 생산한 단백질 산물을 말한다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 재조합 인간 상아질 인산단백질(recombinant human dentin phosphoprotein, rhDPP)을 발현하는 발현 플라스미드를 제작하기 위해 먼저, 인간 상아질 인산단백질을 발현하는 유전자를 PCR(Polymerase chain reaction)을 통해 증폭하였다. 이를 통해 얻어진 증폭된 PCR 산물을 제한효소 처리하여 pBAD-HisA 벡터에 도입시켜, 최종적으로 pBAD-HisA-DPP 재조합 벡터를 제조하였다.

[0035] 본 발명에서 상기 "치수 세포"는 동물 유래의 치수 세포는 제한 없이 포함하며, 이에는 포유류 유래 세포, 조류 유래 세포, 양서류 유래 세포, 어류 유래 세포 등이 포함될 수 있다. 바람직하게는 포유류 유래 치수 세포일 수 있으며, 더 바람직하게는 인간 치수 세포일 수 있다. 치수 세포는 상기 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 발현벡터를 이용하여 대량 생산이 가능해진 재조합 인간 상아질 인산단백질을 이용하여, 치수 세포의 증식이 촉진되고, 세포부착능이 증가하며, 치수 세포에서 상아아세포로의 분화를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 재조합 인간 상아질 인산단백질은 치아 및 골 조직의 회복 및 재생과 관련된 조직 공학적 재료, 치과용 골 재생 치료제 및 의약품 치료제 개발 분야에서 치수 세포의 증식 및 부착을 촉진하는 데에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 좌측 도면은 pBAD-HisA-DPP 발현 벡터를 나타내고, 우측 도면은 Ni-NTA resin을 이용한 affinity 정제를 통해 수득한 rhDPP를 coomassie blue 염색을 통해 확인한 도면이다.

도 2는 rhDPP를 처리하여 hDPC의 세포 부착 활성화에 대해 미치는 영향을 크리스탈 바이올렛 실험(crystal violet assay)으로 확인한 도면이다.

도 3은 rhDPP를 처리하여 hDPC의 세포 증식에 대해 미치는 영향을 MTT 실험으로 확인한 도면이다.

도 4는 rhDPP의 상아아세포 분화 촉진효과를 평가하기 위해서, ALP 활성을 측정한 그래프이다.

도 5는 rhDPP의 상아아세포 분화 촉진효과를 평가하기 위해서, 광화정도를 측정하는 Alizarin Red S 염색한 도면이다.

도 6은 rhDPP가 hDPC의 상아아세포로의 분화에 미치는 영향을 측정하기 위해 상아아세포 분화에 대한 광화마커인 Col1, ALP 및 DMP-1의 mRNA 발현 수준을 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR)을 통해 측정한 결과를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1: 재조합 상아질 인산단백질(rhDPP) 발현 플라스미드 제작**

[0040] 재조합 인간 상아질 인산단백질(recombinant human dentin phosphoprotein, rhDPP)을 발현하는 발현 플라스미드를 제작하기 위해 먼저, 인간 상아질 인산단백질을 발현하는 유전자를 PCR(Polymerase chain reaction)을 통해 증폭하였다. PCR은 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.25 U의 Taq 중합효소 (ELPis, 대전, 한국), 및 50 pmol의 하기 정방향 프라이머(서열번호 1)과 역방향 프라이머(서열번호 2)를 포함하는 30 μ l 반응액을 제조하여 수행되었다.

[0041] rhDPP 정방향 프라이머 (서열번호 1) : 5'-TCTCGAGGATGATCCCAATAGC-3'

[0042] rhDPP 역방향 프라이머 (서열번호 2) : 5'-TGGTACCATTAGTCTGATGTGCTATC-3'

[0043] PCR 조건으로, 55 $^{\circ}$ C로 1분의 어닐링(annealing) 단계, 72 $^{\circ}$ C 1분의 연장(elongation) 단계, 94 $^{\circ}$ C 1분의 변성(denaturation) 단계로 이루어진 사이클을 30회 반복하였다. 상기를 통해 얻어진 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Xho*I, *Kpn*I을 처리하였다. 제한효소 처리 후에, PCR 산물은 pBAD-HisA 벡터에 연결(ligation)시켜 pBAD-HisA-DPP 재조합 벡터를 제조하였다(도 1A).

[0044] **실시예 2: 재조합 상아질 인산단백질(rhDPP) 생산 및 정제**

[0045] 상기 실시예 1에서 제조된 pBAD-HisA-DPP 재조합 벡터를 도입시킨 TOP10 세포들을 37 $^{\circ}$ C LB(Luria broth)-Amp 배지에서 하룻밤 동안 키웠다. 배지의 농도(A₆₀₀)가 0.6에 달하면, 0.1% (w/v) L-아라비노스(L-arabinose)를 첨가하여 DPP 발현을 인덕션(induction)시켰다. 20 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양한 뒤에 원심분리를 통해 침착시켜, 이를 용해(lysed)시키고 음파분쇄(sonicated)하였다. 분쇄물을 14,000g로 30분간 냉장 원심분리(4 $^{\circ}$ C)하여, 그 상청액을 새 튜브에 옮겼다.

[0046] 음파분쇄된 박테리아 상청액으로부터 얻어진 조단백질(crude protein)은 단백질의 아미노 말단에 존재하는 헥사히스티딘 태그(hexahistidine tag)와 결합하는 Ni-NTA resin 컬럼(nickel-nitrilotriacetic acid resin column; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정제하였다.

[0047] 상기 조단백질 및 정제된 단백질을 15% SDS-PAGE(SDS-discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리하였다. 정제된 단백질의 순도는 코마시블루 염색(coomassie brilliant blue staining)을 통해 확인하였다(도 1).

[0048] 도 1에서 볼 수 있듯이, rhDPP는 Ni-NTA resin을 이용한 affinity 정제를 통해 비교적 높은 순도로 얻을 수 있었다. L-아라비노스(L-arabinose)로 인덕션하면, E.coli TOP10은 분자량 12kDa을 가지는 단백질을 생산하였으며, 이는 아미노 말단 히스티딘 태그와 rhDPP로 이루어진 융합 단백질의 예상된 분자량에 해당하였다(도 1B).

[0049] **실시예 3: 인간 치수 세포(hDPC)의 분리**

[0050] 인간 치수 세포(hDPC)는 단국대학교 치의과대학의 치아-두개골 클리닉(dental and Craniofacial Clinic)에서 19세 내지 25세 성인 환자의 서면 동의하에 제3대구치를 수집하여 이로부터 수득하였다. 구체적으로는, 치관과 치근에서 치수조직을 분리·분쇄하여 37 $^{\circ}$ C에서 한 시간 동안 제1형 콜라게나제 3mg/ml 및 dispase 4mg/ml을 포함하는 용액을 처리하였다. 상기 처리액을 70 μ m 여과기를 통과시켜서 단일세포 현탁물(single cell suspension)을 얻었다.

[0051] hDPC는 가열 불활성화시킨 우태아 혈청 10%(fetal bovine serum, FBS; WELGENE, 대구, 한국), 페니실린 G 소디움 100 U/ml, 스트렙토마이신 설페이트 10 μ g/ml, 및 암포테리신 B (amphotericin B, WELGENE, 대구, 한국) 25

$\mu\text{g/ml}$ 를 포함하는 a-최소 필요 배지(a-minimum essential medium, a-MEM, WELGENE, 대구, 한국)에 37°C 5% CO_2 환경에서 배양되었다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA(WELGENE, 대구, 한국)로 5분간 처리하여 분리하여 계대 배양하였다. 세포 증식과 분화실험에는 3~4계대 배양된 hDPC를 사용하였다.

[0052] 실시예 4: 치수 세포 부착 실험

[0053] 먼저, 24-well 플레이트를 상기 실시예 2에서 수득한 rhDPP로 4°C 에서 하룻밤동안 코팅시켰다. 이렇게 rhDPP로 코팅시킨 24-well 플레이트에 1%(w/v) BSA(bovine serum albumin)를 함유하는 PBS(phosphate-buffered saline)로 30분간 blocking을 하고, hDPC를 5×10^4 세포/well의 농도로 접종하였고, PBS로 세척하였다. 37°C 에서 50분간 정치해 둔 뒤에 플레이트를 PBS로 두 번 세척하고, 부착된 세포를 3% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 고정(fixed)하고 2%(v/v) 에탄올/물 용매에 녹인 5%(w/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 용액으로 염색하였다. 증류수로 세척한 다음, 플레이트를 건조시켰다. 염색 정도를 마이크로플레이트 리더(microplate reader, BioRad Laboratories, CA, USA)를 이용하여 A_{570} 으로 측정하였으며, 1% BSA로 코팅한 경우를 대조군으로 사용하였다.

[0054] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이 hDPC의 세포 부착 활성은 대조군(control)과 비교하여 rhDPP를 처리했을 때 농도의존적으로 현저하게 증가하였다 ($p < 0.05$). rhDPP를 처리했을 때 hDPC의 세포 부착 활성은 대조군에 비하여 모든 농도에서 3배 이상 극적으로 증가하였다. 이러한 결과는 rhDPP가 hDPC의 부착 활성을 촉진하는 기능을 함을 보여준다. 이러한 결과를 바탕으로 추후 실험은 $5\mu\text{g/ml}$ 의 rhDPP를 처리하여 진행하였다.

[0055] 실시예 5: 치수 세포 증식 실험

[0056] 치수 세포 증식 활성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole, AMRESCO Inc., Solon, OH, USA) 실험을 통해 측정하였으며, 이는 제조사의 지침에 따라 살아있는 세포의 수를 측정하는 것이었다. 인간 치수 세포(hDPC)는 24-well 플레이트에서 1×10^3 세포/well의 농도로 5일 또는 10일 동안 배양되었다. 이후, $500\mu\text{l}$ MTT 용액(5mg/ml , PBS)를 각 well에 처리하고 4시간 동안 정치한 후에, 배지를 제거하고, 세포 내에 형성된 프로마잔 크리스탈(fromazan crystal)을 $200\mu\text{l}$ 의 DMSO에 녹였다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm 파장에서의 각 well의 흡광도를 재었다.

[0057] rhDPP를 처리한 경우에 대조군에 비하여 hDPC의 증식이 현저히 촉진시키는 것을 확인하였다(도 3). 도 3에서 볼 수 있듯이, rhDPP는 hDPC의 세포 증식 활성을 5일째와 10일째에서 증가시켰다($p < 0.001$).

[0058] 실시예 6: 치수 세포 분화 실험

[0059] rhDPP의 상아아세포 분화 촉진효과를 평가하기 위해서, 상아아세포의 특징인 ALP 활성을 측정하였고, 광화활성을 측정할 수 있는 Alizarin Red S 염색 실험을 하였다. 먼저, hDPC를 rhDPP가 있거나 없는 분화 유도 배지에서 1×10^3 세포/well의 농도로 0일, 7일 및 14일 동안 배양하였다. 상기 분화 유도 배지는 $100\mu\text{mol/l/ml}$ 아스코르브산(ascorbic acid), 2 mmol/l b-글리세로포스페이트(b-glycerophosphate), 및 10 nmol/l 텍사메타손을 함유하고 있다.

[0060] 그 후, ALP 활성을 측정하기 위하여 hDPC를 PBS로 세척하고, 1.5M Tris-HCl($\text{pH } 10.2$), 1 mM ZnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 및 1% TritonX-100을 포함하는 용해 완충액으로 4°C , 10분간 용해하였다. 원심분리 이후에 알칼라인 포스페이트 측정 키트(Alkaline phosphate assay kit, Sigma, St.Louis, MO, USA)를 이용하여 세포 용해물의 ALP 활성을 측정하였다. 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 대조군에 비교하여 정상화하였다.

[0061] 또한, 광화활성을 확인하기 위해서는 hDPC를 PBS로 세척하고, 95% 메탄올에 30분간 고정시킨다. 다음, 세포를

Alizarin Red S 용액으로 하룻밤 동안 염색하고, PBS로 세 번 세척하고, 15 분간 인큐베이션(incubation)하여 비특이적 염색을 제거하였다. 0일, 7일 및 14일째의 염색된 양상을 사진으로 확인하였다.

[0062] ALP 활성을 확인한 결과, ALP활성이 0일째에는 대조군과 rhDPP를 처리한 실험군간에 차이가 없었으나, 이후 rhDPP를 처리한 실험군은 대조군에 비해서 7일째에는 약 2.3배, 14일 째에는 약 6배의 ALP 활성의 증가를 보였다(도 4).

[0063] hDPC에서 rhDPP를 처리한 실험군의 광화작용을 확인한 결과, 0일째에는 Alizarin Red S에 의해 염색된 세포가 관찰이 되지 않았고, 7일째 및 14일째에는 염색된 세포들이 관찰되었다. 특히, 14일째에는 거의 모든 세포가 염색된 것을 확인할 수 있었다(도 5). 이러한 결과는 ALP 활성 결과와 일치하는 결과이다.

[0064] 실시예 7: 치수 세포 RNA 추출 및 cDNA 합성

[0065] 총 RNA는 Easy-spin RNA Extraction kit (iNtRON, 서울, 한국)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 추출하였다. RNA의 순도는 260nm 및 280nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 평가하였으며, A_{260}/A_{280} 의 비율이 1.9 내지 2.1인 경우에는 허용가능한 것으로 보았다. 또한, 18S RNA와 28S RNA는 겔 전기영동시켜 ETBR(ethidium bromide) 염색으로 확인하였다. RNA 농도는 A_{260} 을 통해 측정되었다. 총 RNA 2 μ g을 50U Super-Script II 역전사효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 μ M DTT, 40U RNaseOUT 재조합 라이보뉴클레아제 억제제(recombinant ribonuclease inhibitor), 0.5 μ mol의 무작위 헥사뉴클레오티드(random hexanucleotide) 프라이머 및 500 μ mol dNTP 혼합물(mixture)을 포함하는 20 μ l의 반응액을 통해 역전사시켰다. 역전사 반응은 50℃에서 60분간 진행되었다. 그 뒤로, 반응액을 70℃ 15분간 가열하여 반응을 종료시켰고, 생성된 cDNA는 -20℃에 보관되었다.

[0066] 실시예 8: 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR) 분석

[0067] rhDPP가 hDPC의 상아아세포로의 분화에 미치는 영향을 측정하기 위해 상아아세포 분화에 대한 광화마커인 Col1, ALP 및 DMP-1의 mRNA 수준을 측정하였다. 해당 유전자의 발현을 상기 실시예 7에서 얻어진 cDNA를 주형으로 하여 정량적 실시간 PCR을 통해 확인하였다. 모든 실시간 PCR은 ABI Step One real-time PCR system에서 이루어졌다. 각 반응은 0.1 μ M의 정·역방향 프라이머, 13.5 μ l의 2-SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem, AmpliTaq Gold DNA polymerase 와 이의 버퍼, dNTPs 혼합물, SYBR Green I dye, Rox dye, 및 10 mM $MgCl_2$), 및 1.5 μ l 주형 cDNA를 함유하는 15 μ l의 반응액을 포함하였다. 전형적인 증폭 프로그램으로 94℃에서 10분동안 효소를 활성화시키고, 이어 94℃ 15초의 변성(denaturation)단계와 60℃ 1분의 어닐링(annealing) 및 연장(elongation)의 단계를 한 사이클로하여 40회 반복하였다. 각 유전자에 대한 C_T (cycle threshold) 값은 ABI 장치의 자동 한계 분석 기능을 통해 결정되었으며 C_T (GAPDH)와 비교하여 정규화하여 dC_T 값을 얻었다. C_T 나 dC_T 값 사이의 n 수의 차이는 목적 서열을 갖는 cDNA 샘플간에 2^n 배의 양 차이를 가짐을 뜻한다. 정량적 실시간 PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 1에 기재되어 있다.

표 1

[0068] 정량적 실시간 PCR에 사용된 프라이머

Gene	정방향 프라이머(5'-3')	역방향 프라이머(5'-3')
GAPDH	TGGAAGGACTCATGACCACA (서열번호 4)	TTCAGCTCAGGGATGACCTT (서열번호 5)
Col1	GAAATGGAGCTCCTGGTCA (서열번호 6)	ACCCTTAGCACCAACAGCAC (서열번호 7)
ALP	CCAAAGGCTTCTTCTTGCTG (서열번호 8)	CCACCAAATGTGAAGACGTG (서열번호 9)
DMP-1	CCCAGTGACAGCACTCAGTC (서열번호 10)	CTCCTTTTCTGTGCTCCTG (서열번호 11)

[0069] rhDPP를 처리하거나 처리하지 않은 상태로 배양된 hDPC의 유전자 발현 정도를 확인한 결과, rhDPP를 처리하였을 때 DMP-1의 mRNA 발현은 큰 차이를 보이지 않았으나, Col1 및 ALP의 mRNA 발현이 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가하였다. 특히, ALP의 발현은 1.6배 가량 증가하였다(도 6). 이러한 결과는 상기 결과들과 함께, rhDPP가 hDPC의 상아아세포 분화에 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0070] 실시예 9: 통계 분석

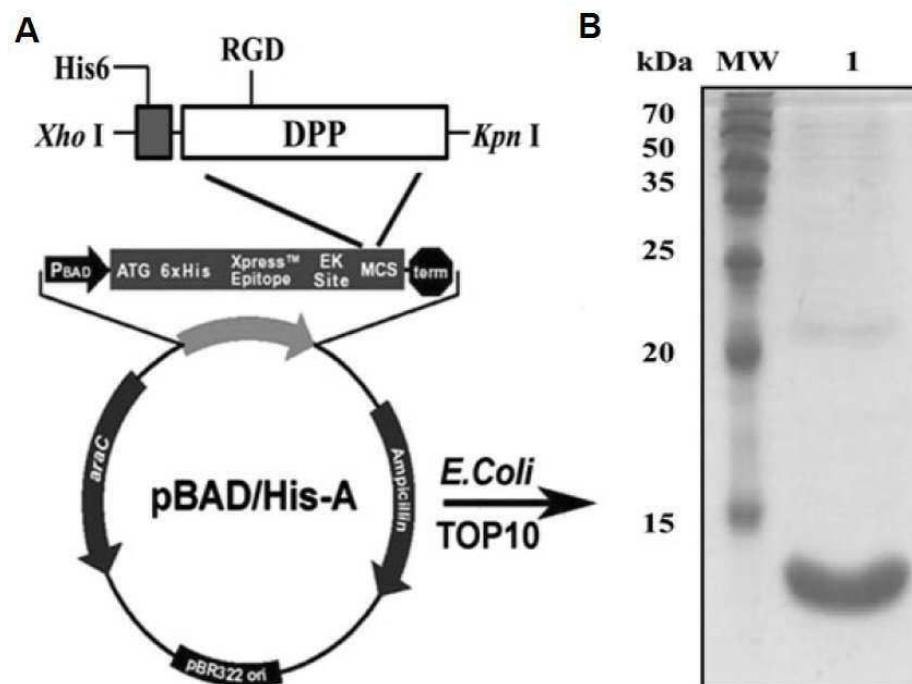
[0071] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD, standard deviation)로 표현되었다. 통계 분석은 SAS 프로그램을 통해서 수행되었다. 두 그룹간 차이는 Student t-test를 통해 테스트되었다. 모든 통계 분석에서 p value는 0.05 이하로 유의미함을 보였다.

[0072] 상기 결과들을 종합하면, rhDPP가 hDPC의 상아아세포 분화에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 치수 세포의 증식, 부착을 촉진시키는 기능을 가지므로, 이를 치아의 재생에 이용할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

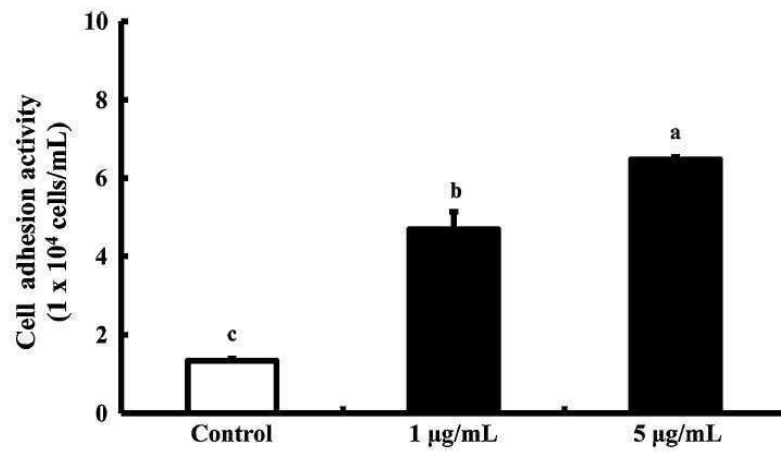
[0073] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

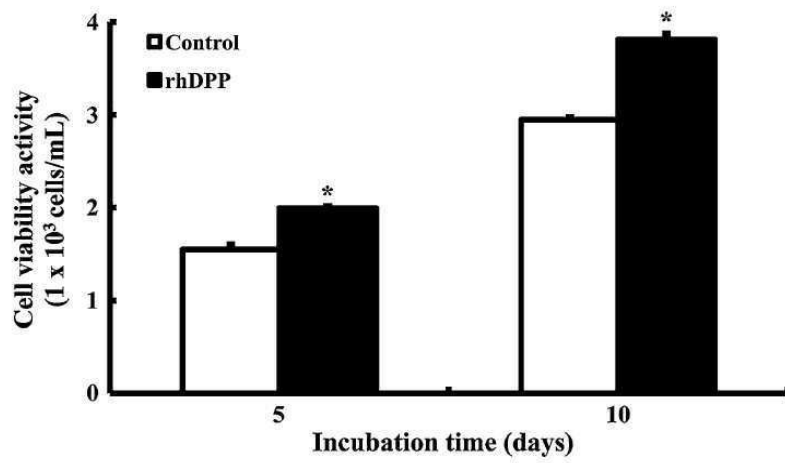
도면1



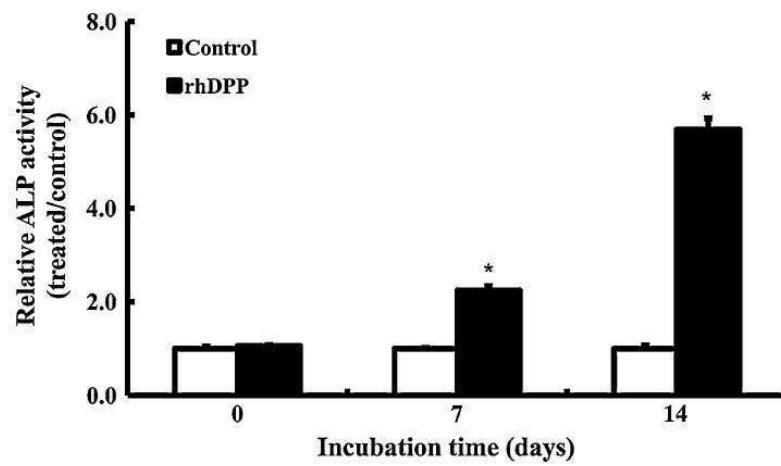
도면2



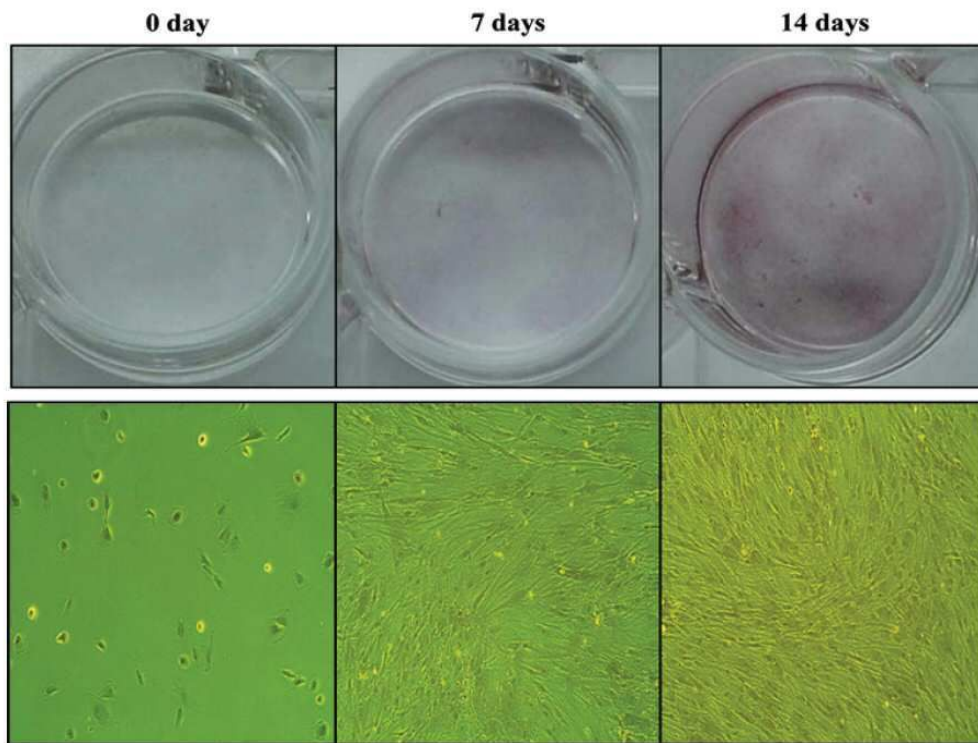
도면3



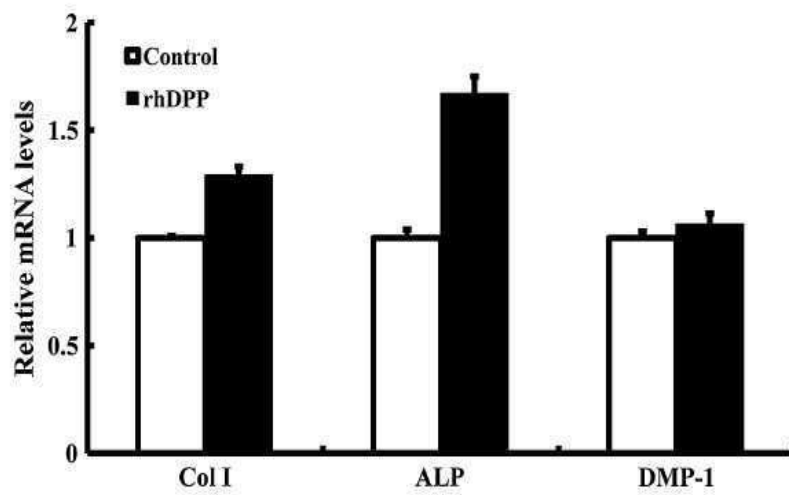
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Dankook University Cheonan Campus Industry Academic Cooperation Foundation
- <120> Composition for adhesion or proliferation of dental pulp cells comprising recombinant dentin phosphoprotein
- <130> PA120995/KR
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hDPP primer F
 <400> 1
 tctcgaggat gatcccaata gc 22
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> hDPP primer R
 <400> 2
 tgggtaccatt agtctgatgt gctatc 26
 <210> 3
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> human DPP
 <400> 3
 Asp Asp Pro Asn Ser Ser Asp Glu Ser Asn Gly Asn Asp Asp Ala Asn
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Asp Asn Asn Ser Ser Ser Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Ser Asp Glu Ser Lys Asp Asn Gly Asn Gly Ser Asp Ser Lys Gly Ala
 35 40 45
 Glu Asp Asp Asp Ser Asp Ser Thr Ser Asp
 50 55
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH primer F
 <400> 4
 tggaaggact catgaccaca 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH primer R
 <400> 5
 ttcagctcag ggatgacctt 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Coll primer F
 <400> 6
 gaaaatggag ctctgtgtca 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Coll primer R
 <400> 7
 acccttagca ccaacagcac 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALP primer F
 <400> 8
 ccaaaggctt cttcttgctg 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALP primer R

<400>	9	
ccaccaa	atg tgaagacgtg	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DMP-1 primer F	
<400>	10	
cccagtgaca	gcactcagtc	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DMP-1 primer R	
<400>	11	
ctccttttcc	tgtgctcctg	20