

제 3 차년도  
최종 보고서

## 각막내피세포이식

Corneal Endothelial Cell Transplantation

가톨릭대학교 의과대학

과 학 기 술 처

# 제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “각막내피세포이식에 관한 연구”과제의 최종 보고서로 제출합니다.



1997. 8. 31.

주관연구기관명: 가톨릭대학교 의과대학

총괄연구책임자: 주 천 기

연구원:	황 은 주	주 영 선
"	: 이 주 경	신 숙 영
"	: 조 해 지	영 섭
"	: 김 지 준	
"	: 박 지 준	
"	: 최 준 섭	

# 요 약 문

## I. 제 목

각막내피세포이식

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

각막혼탁은 시력저하를 일으키는 주된 원인으로 인공 장기가 아닌 남의 장기로 대신해야하는 이식으로만이 각막의 기능을 원상복귀할수 있다. 각막이식술은 이식후 투명성을 찾는 성공률이 90%에 이르고 있으나 5년 동안 추적관찰을 해 보면 약 30%에서 거부 반응이 있고 위험인자 (high risk factor)가 있는 경우에는 성공률이 10-20%이다. 그러므로 각막이식술의 거부반응을 줄이고 공여각막을 확보하기 위하여 세포이식술로의 발전이 시급하다.

각막내피세포는 재생이 안되는 단일 세포층으로  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumping작용을 계속함으로써 각막의 투명성을 유지시키므로 이들 세포의 손상이 각막혼탁을 유발하는 주요인으로 각막혼탁의 50% 이상을 차지한다. 이와같이 재생 불가능한 각막내피세포의 기능저하가 각막이식대상의 대부분이라는 점과 전층각막이식이 여러 경우에서 거부반응이 높다는 점을 감안하여 여러 연구소에서 각막내피세포의 선택적 세포 이식술이 시도되고 있다.

바이러스나 plasmid등의 tool을 이용하여 유전자를 세포내에 넣어 줌으로서 질병을 치료하고자 하는 실험이 여러 연구소에서 이루어 지고 있는데 본 연구에서 시도하고 있는 각막내피세포이식 역시 이러한 virus tool을 이용한 이식기술이다. 특히 안구내의 전방(Anterior chamber)은 면역학적으로 ACAID(Anterior Chamber Associated Immune Deviation)을 일으키는 특이한 장소로서 virus hybrid가 들어가 있는 세포들이 그 생명력이 잘 유지되면서 작용할수 있는 좋은 환경으로 세포 이식술의 문제점이나 연구방향등을 쉽게 제시할 수 있는 모델이라 하겠다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

세포의 재생능력에 제한이 있는 마우스 각막내피세포에 virus로 SV40 T항원을 주입하여 재생능력을 갖게하고(supercell), thymidine uptake검사로 재생능력을 확인 하였으며 정상세포와 같은 세포의 성장인자 수용체발현을 확인하기 위하여 EGFR, FGFR, PDGFR, TGF-B에 대하여 면역조직화학검사를 시행하였다. 또한 Descemet막위에 결합시 형태학적으로 정상세포와 유사함을 확인하기 위하여 형광염색으로 이식할 세포를 염색하여 위상차광학현미경으로 확인 하였으며 미세구조의 변화와 증식과정을 경면 전자현미경으로 조사하였다. In vivo실험에서 supercell로 대치된 마우스의 각막을 이식함으로써 술후 투명성을 유지하는것과 지속적인 supercell존재를 확인하였다. 그러므로 전층각막이식으로만 해결해온 각막내피세포의 기능저하로 인한 각막부종과 혼탁을 거부반응이 적고 본인의 조직을 이용하는 각막내피세포이식으로 대치하는 새로운 기술의 장을 열었다. 이러한 supercell의 phenotype 변화를 조사하기 위하여 생성하는 교원질을 정상세포에서 생성하는 교원질과 비교하였으며 Ouabain으로 각막내피세포의 생리적 기능( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump 작용)을 조사하였다. 연구후반에는 liposome을 이용한 SV40 T항원을 세포내로 주입하는 방법을 정립하였다. 이를 위해 in vitro와 in vivo에서



B-galactosidase를 lipofectamine과 같이 각막내피세포내로 주입하여 X-gal로 확인하는 연구를 하였고 이연구에서 최종적으로 주입하고자 하는 SV-40 T 항원을 주입하고 Ab-2(SV40 T항원에 대한 항체)로 확인하였다.

#### IV. 연구개발결과

세포의 재생능력에 제한이 있는 마우스 각막내피세포에 virus로 SV40 T항원을 주입하여 계대배양하여 정상 마우스 각막내피세포는 제 3세대까지만 배양되는것을 25대이상 계대배양되는 cell line을 구축하고 supercell이라고 명명하였다. 재생능력을 갖게하고(supercell) 세포들이 정상각막내피세포와 마찬가지로 같이 EGF, PDGF의 수용체와 TGF- $\beta$ 를 갖고 있었다. 또한 thymidine uptake검사로 재생능력을 확인한 결과 정상세포보다 의의있는 재생능력을 나타냈으며 형태역시 시험관내에서와 Descemet막위에서 정상세포와 유사하였다. 미세구조를 Descemet막위에 결합시키고 경면 전자현미경으로 조사한 결과 1-6시간에서 유착을 시작하였고 시간이 경과할수록 각막내피세포의 원래의 모습인 평편세포 모양을 나타냈으며 일부는 세포분열모양을 보였다. In vivo실험으로 실제 각막내피세포이식을 시행한 결과 20%에서 각막의 투명성을 나타냈으며 1주째 관찰에서는 이식된 형광물질로 염색된 supercell이 flat mount에서 관찰되었다. Supercell의 phenotype 변화에서는 주로 생성하는 교원질이 type IV에서 type I으로 바뀌어져 있었으며 각막내피세포의 생리적 기능( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump 작용)을 조사하는 Ouabain uptake조사에서도 supercell은 정상각막내피세포보다 의의있게 감소되어 있었다. 세포의 형질을 바꾸지 않고 SV40 T항원을 세포내로 주입하는 방법을 정립하는 연구후반에서는 liposome을 이용하였는데 in vitro에서는  $\beta$ -galactosidase가 각막내피세포로 efficiency가 높게 잘 주입되었으며 in vivo에서도 전방에 주입된  $\beta$ -galactosidase가 각막내피세포층과 상피의 basal 세포층에 잘 주입되었다. 이연구에서 최종적으로 주입하고자 하는 SV-40 T 항원을 각막내피세포에 in vitro로 주입하는 실험에서는 efficiency는 낮았으나 well의 주변부에 있는 세포에서, 밀집되어 있지 않은 세포에서 성공적으로 주입된것이 Ab-2(SV-40 T항원에 대한 항체)로 확인되었다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

이는 각막내피세포의 수가 적어 시력저하가 유발되는 경우와 안과이외의 영역에서 퇴행성 뇌질환과 성인병과 같이 필요한 세포의 기능이 저하된 경우, 우리몸의 정상기능의 유지와 기능향진을 위하여 세포증식이 필요한 경우에 도입될수 있는 새로운 증식방법으로 해결못했던 질병 치료에 새로운 방법을 제시하게 되었다.

# S U M M A R Y

## (영 문 요약 문)

### I. Title: Corneal Endothelial Cell Transplantation

### II. Specific Aims and Object:

Corneal opacity is a major cause for visual disturbance, which can be cured only by live tissue transplantation. Although the success rate reached about 90% in general, rejection reaction have been observed in 30% for 5 years and success rate decreases to 10-20% in cases with high risk factor. Therefore, transition from organ transplantation to cell transplantation has been necessary to reduce rejection rate in corneal transplantation.

Corneal endothelial cell(CEC) is not regenerative and corneal transparency is maintained by its  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumping action. The impairment of its function is main cause(>50%) of corneal opacity. So, many institutes have focused on CEC transplantation instead of corneal transplantation for restoring corneal transparency.

The experiments of gene transfection into specific cell using viral vector or plasmid have been performed in several institutes, recently. In this study, CEC was treated with SV-40 virus(Supercell) or transfected with SV-40 T Ag. Corneas replaced with Supercells were transplanted onto recipients. Eye has an environment of immune privilege. Especially, Anterior chamber revealed a specific immunologic response termed as anterior chamber associated immune deviation(ACAID). Therefore, it was supposed that transplantation of Supercells would be successful and the results in this project would suggest the problem and direction of cell transplantation in various fields of life science.

### III. Contents and Fields

Murine CECs was infected with SV-40(Supercells). We tested Supercells proliferation ability using thymidine uptake assay, membrane receptors for EGF and PDGF, and TGF- $\beta$  expression using immunohistochemical staining. For morphological study Supercell tagged with fluorescein on Descemet membrane were observed with inverted phase contrast light microscope. The ultrastructure and attaching process on Descemet's membrane of Supercells were observed with electron microscope. Murine corneas replaced with Supercells were grafted syngeneically. In this experiment, transparency of grafted cornea and presence of supercell on the grafted cornea were examined.

In the study of phenotype change of Supercell, collagen produced by supercell was examined using Western blot. The physiologic function of Supercell was examined with Ouabain test. In later experiments, transfection of gene protein was tried in CEC. In the first step of this experiment, we transfected bovine CECs with  $\beta$ -galactosidase using lipofectin and confirmed the transfection with X-gal. With this result we determined optimal condition of transfection into CECs and transfected SV-40 T Ag was confirmed with Ab-2.



#### IV. Results

Murine corneal endothelial cells(MCECs) were infected with SV-40 virus hybrid. These CECs, called Supercell, could be subcultured over 25 passage, whereas original MCECs could not be subcultured beyond 3 passage. The proliferation of Supercells was confirmed using thymidine uptake assay. Supercells expressed growth factor receptors like EGFR and PDGFR and TGF- $\beta$ . These expressions were same as original NCECs' expressions. The size and morphology of Supercell were similar to those of original MCECs. Supercells were observed with scanning and transmission electron microscope. Those were round at one hour and became flat depending on time manner. Some of those revealed mitotic figure. When cornea replaced with Supercell was transplanted on to syngeneic mouse, the success rate reached 20%. In successful grafting, Supercells tagged with fluorescence were found in there. However, major type of collagen produced by Supercells was changed from type IV to type I and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumping action was decreased. In later experiments, transfection of gene protein into CECs were performed. We transfected  $\beta$ -galactosidase into bovine corneal endothelial cells(BCECs) using lipofectin. This transfection was confirmed with X-gal staining. The efficiency of transfection reached to about 80-90%. In vivo study, we injected  $\beta$ -galactosidase and lipofectin into anterior chamber and confirmed the transfection with X-gal. The efficiency was about 5% and the expression was found in basal cell layer of corneal epithelium and endothelium. Finally, SV-40 T Ag was transfected into BCEC with above mentioned method. The transfection was confirmed with Ab-2. SV-40 T Ag was nicely transfected into BCEC. The efficiency was high in peripheral area in the well and in low cell density, while that was low in center of the well and in high cell density.

#### V. Further Plan

New technology in this study would be applied to replace the defective cells with cells containing specific gene in the field of Ophthalmology and in another fields of life Science. Transfection of gene protein into specific cells will be used to improve function of organ. These results suggested the key to understand unsolved problems found in organ and cell transplantation.

# C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	-----	8
Chapter 2. Current Status of the Related Research	-----	10
Chapter 3. Content and Results	-----	13
Chapter 4. Achievement of Research Goals and Contribution the Science	-----	27
Chapter 5. Plan for Future Studies	-----	30
Chapter 6. References	-----	31

## 목 차

제 1 장. 서	론	-----	8
제 2 장. 국내외 기술개발 현황		-----	10
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과		-----	13
제 4 장. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도		-----	27
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획		-----	30
제 6 장. 참고문헌		-----	31



# 제 1 장 서론

- \* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

## 제 1 절: 연구개발의 목적과 필요성

### 1. 기술적 측면

각막혼탁을 일으키는 원인으로는 선천적으로 오는 유전적인 각막변성과 후천적으로 오는 외상, 허페스 바이러스 감염 후 후유증, 백내장 수술후의 합병증, 녹내장 후유증, 면역 질환의 염증등을 들 수 있다. 현대의학의 발달로 인공 장기가 신체 여러부분의 대치용으로 쓰여지고 있으나, 눈에서 생리작용을 계속해야 하는 각막은 남의 장기로 대신해야하는 이식으로만이 그 섬세한 작용을 할 수 있다. 각막이식은 1906년 Edward Zirm이 처음 인체에서 성공을 한 이후 성공률을 높이기 위해 다각적인 노력이 여러 안과 연구소에서 행하여지고 있다. 근래에는 수술기구, 수술 현미경등의 수술기법의 발달과 면역억제제등 의학의 발달로 이식후 투명성을 찾는 성공률이 90%에 이르러 있다. 그러나 5년 동안 추적관찰을 해 보면 약 30%에서 거부 반응으로 인한 시력저하, 각막혼탁이 재발되며 그에 대한 대안이 시급한 형편이다. 또한 위험인자 (high risk factor)가 있는 경우 즉 전에 각막이식후 거부반응이 있었던 경우, 신생혈관이 이미 각막윤부에 있는 경우 등은 그 성공률이 현저히 떨어져 10-20%인 것이다.

각막혼탁의 주원인은 각막내피세포의 기능저하가 50%이상을 차지한다. 또, 각막내피세포는 재생이 안되는 단일 세포층으로  $Na^+ - K^+$  pumping 작용을 계속함으로써 각막의 투명성을 유지시킨다. 그러므로 각막내피세포층은 근시교정술, 백내장 수술, 녹내장 수술등 여러 안과 수술 기법에서 절대적으로 손상을 주지 않도록 주의해야 하는 것으로 성역시 되고 있다. 그러나 콘택트렌즈 장기 착용자 또는 고연령자에게서 이러나는 연령의 증가에 의한 자연손실이나 백내장 수술등 안내 수술기법에 의한 피할 수 없는 이들 세포의 손상은 장기적으로 볼 때 결국 각막혼탁을 유발하는 요인인 것이다. 이와같이 재생 불가능한 각막내피세포의 기능저하가 각막이식 대상의 대부분이라는 점과 전층각막이식이 여러 경우에서 거부반응이 높다는 점을 감안하여 여러 연구소에서 각막내피세포의 선택적 세포 이식술이 시도되고 있다.

### 2. 사회 경제적 측면

현 국내실명자 10만명 중 1만명이 각막이식으로 시력을 찾을 수 있다고 추산되고 있으나 뇌사 문제, 유고사상 등으로 국내장기이식술은 국내에서 한계적으로 이루지고 있다. 특히 각막이식은 그 대상자가 많음에도 불구하고, 기증자가 적어 여러 종교단체에서 홍보를 하고 있으나 미국의 40,000 - 50,000건의 각막이식술에 비하여 약 300-400건수로 매우 빈약하다. 또한 각막이식 수술기법등에는 선진국 수준임에도 불구하고 Donor용 안구보족으로 많은 실명자가 애타게 그 순서를 기다리고 있으며 대학병원이나 큰 종합병원 안과에서도 각막이식술을 할 준비는 되어 있으나 이식할 각막 부족으로 대상자만 등록해 놓고 안구를 기다리고 있는 실정이다. 최그네는 미국이나 호주 등지에서 안구를 수입하여 각막이식을 추가로 하고 있으나 그 숫자는 매우 한정적이다. 안구 기증자가 부족한 것은 차츰 국민의 공감대가 형성되어 차츰 나아질 것으로 기대되나 실질적인 문제는 Donor용 안구의 사인이 분명치 않은 경우와 연령층이 높거나 다른 원인에 의해 각막내피세포 숫자와 형태학적 기능의 저하로 이식술에 사용 못하는 경우가

30 - 40%에 이르고 있는 것이다. 그러므로 각막내피세포의 기능 부족으로 이식술에 사용 못할 경우에는 안구기증자의 뜻을 못 살리게 되어 모처럼의 국민 공감대 형성에 저해 요소가 되고 있다.

## 제 2절 연구의 범위

세포이식술은 Parkinson질병등 신경고학, 당뇨병등 내분비학등 생명과학분야에서 최근 들어 활발히 연구되고 있다. Herpes virus나 Adeno virus등의 tool을 사용하여 우리가 이용하고자 하는 vector를 세포내에 넣어 줌으로서 질병을 치료하고자 동물실험을 시도하고 있다. 본 연구에서 시도하고 있는 각막내피세포이식 역시 이러한 virus tool을 이용한 세포차원의 이식기술이다. 특히 안구내의 전방(Anterior chamber)은 면역학적으로 ACAID(Anterior Chamber Associated Immune Deviation)을 일으키는 특이한 장소로서 virus hybrid가 들어가 있는 세포들이 그 생명력이 잘 유지되면서 작용할 있는 좋은 환경이다. 각막내피세포는 전방과 접하고 있어서, virus로 transfection 시킨 후 이식을 하면, 이세포들이 원하고자 하는 형질을 간직한 채 정상적인 생리 기능을 잘 나타낼 것으로 기대되며 세극등 현미경으로 이들세포의 기능을 지속적으로 쉽게 뚜렷이 알 수 있다. 그러므로 최근 추진되어지는 세포 이식술의 문제점이나 연구방향등을 쉽게 제시할 수 있는 모델이라 하겠다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- \* 국.내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국.내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

세포이식술은 당뇨의 beta islet 세포의 이식으로 당뇨병을 치료하고자 하는 노력으로부터 시작되어 각종장기의 이식시에 나타나는 문제를 해결하고자 하는 노력으로 세계각국의 연구소에서 앞다투어 연구를 활발히 진행하고 있다. 신경과학분야에서도 파킨스질병, Alzheimer질병, Huntingtons질병등이 선택적인 신경세포사의 형태를 나타내므로 성장인자 주입, 유전자 치료와 더불어 세포이식을 광범위하게 시도하고 있다. 전반적으로 세포의 기능이 떨어져서 야기되는 문제, 즉 성인병과 퇴행성질환에서 세포이식은 세포에 유전자 치료와 더불어 질병해결의 열쇠를 갖고 있다고 하겠다. 최근에는 embryo시기의 세포를 이식하는것이 아니라 세포가 생존하는데 필요한 유전자를 주입시킨후 이식해주는 기법이 개발되어 암세포에 성장억제인자를 넣어 이식해 주는 방법과 함께 시도되고 있다. 물론 유전자 주입에 따른 세포형질의 변화, vector나 plamid에 의한 세포의 항원성 변화와 세포독성작용등이 해결해야할 문제로 남아 있으나 이는 미래 유전공학분야에서 곧 해결되어질 분야이다.

안과분야에서 각막이식은 우리몸의 장기이식중에서 골 다음으로 활발히 시행되고 있다. 그러나 아직 이식거부반응에 대하여 해결하지 못하는 분야가 많고 공여 각막의 부족으로 각막내피세포이식이 필요한 실정이다. 또한 평균수명의 연장과 생활의 질을 추구하는 현실에서 시력이 매우 중요하나 황반부 변성에 의한 시력저하, 망막상피세포의 결합으로 인한 맥락막 신생혈관의 성장등이 나이에 따라 빈도가 높아지므로 큰 사회문제로 대두되고 있다. 망막신경세포이식과 망막상피세포이식이 현재 시도되고 있으며 이들세포이식은 어린망막을 slice section을 하는 경우와 시험관내에서 세포를 배양하여 이식해주는 방법이 Washinton대학과 Havard대학에서 주도하여 실행되고 있다. 세포이식후 신경세포와의 연접은 전자현미경을 이용한 미세구조 관찰로 확인되었으나 안정성과 기능적 회복은 관찰의 어려움으로 난항을 겪고 있다. 그러므로 관찰이 용이한 각막내피세포 이식에 의한 실험수행이 절대 필요한 실정이다. 이에대한 연구는 일본과 미국의 UCSF대학등에서 수행을 계획하고 있다.

본연구자는 92년 8월부터 미국 Washington대학 각막 연구실에서 Post Doc.fellow로 연구를 시작할 때부터 각막내피세포 이식에 대해 Pepose교수와 Fleming조교수로부터 공동연구 제안을 받았다. 그들은 앞으로의 이식술은 전층조직이식에서 각층의 세포 이식으로 전환한다는 것과 이식수의 거부반응을 세부적으로 연구하려면 각층별, 세포별로 따로 해야 한다고 설명하면서 계획을 수립하여 제시했었다. 당시 본인의 주 연구과제는 마우스에서 각막이식 후 T-림파구의 면역 반응이었는데 마우스에서 각막이식술은 91년 University of Illinois 의 Dr. She에 의해 처음 발표된 이후 USC의 Dr.Rao실험실과 Southwestern Medical Center의 Dr. Niederkon 실험실에서 주로 시행되었다. 본인은 그 곳을 차례로 방문하여 마우스 각막이식술 technique을 배운후 St. Louis에 있는 Washington에 대학과 V.A 병원 2군데 연구실에서 각막이식을 시작하였었다. 그후 미국내에서 마우스각막이식팀은 Northwestern 대학의 Dr.Niederkon연구실, NIH의 Dr.Nussenblatt 연구실등에서 시행되어지고 있다. 마우스에서의 각막이식은 직경 2mm



의 각막에 특수한 봉합사인 11-0nylon으로 12군데 균일하게 봉합해야 하는 시술의 어려움은 있으나 면역반응이 가장 잘 알려져 있고, 각막조직의 면역세포분포가 가장 사람에게 가깝다는 장점이 있다. 또한 동물실험실에서 장소를 적게 차지하고 깨끗한 마우스 실험동물을 각막이식 반응 검사에 사용하기 위해 여러 연구자들이 갈망해 왔으나 마우스 각막은 이식술하기에 너무 작아서 technique의 한계점으로 여겨져 왔다. 본 연구자는 미국에서 2년간 연수기간중 6백-7백 마리의 각막이식술을 마우스에서 해 왔으며, 근래에는 하루에 15마리의 sample을 만들어 실험했었다. 이와같은 수술경험자는 국내는 물론 국외에서 조차 찾기 없으리라 확신한다. 각막 내피세포를 Descemet 막에 붙여서 각막이식을 할 경우 두가지 보안해야할 문제가 있었다. 각막내피 세포를 Descemet막에 붙힌 후 각막이식을 할 때 수술중 떨어져 나가는 세포들의 처리인데 이는 각막이식전 배양액에서 충분히 Descemet막에 확실히 붙지 않은 세포들을 제거하고, 수술중에는 점탄물질인 Healon을 사용해서 보안하였다. 둘째는 각막을 culture system에서 1시간 동안 배양해야 하므로, 약간의 부종 상태등으로 인한 수술적 어려움이였다. 이는 그동안 각막이식 면역학을 하면서 쌓았던 수술경험을 바탕으로 극복되었다. 이 연구는 93년부터 미국 Washington 대학에서 지도교수인 Dr.Pepose와 Dr.Fleming과 같이 시작해서 in vitro 예비실험에서 성공 가능성을 알수 있었으나 94년 7월말 본인의 귀국으로 인하여 실제로 in vivo에서의 확인과 in vitro실험에서의 마무리가 중단된 상태이었는데 이번 3년에 걸친 국제 공동연구으로 마무리 할 수 있었다.

이번과제의 성공적인 수행을 위하여 Pepose교수와 Fleming조교수 team은 먼저 마우스에서 각막내피세포배양을 본연구자에게 부탁하였고 본 연구자는 마우스 각막이식에 사용하던 미세수술 기구를 사용하여 세계 최초로 이 세포들의 배양에 성공하였고, 이들 각막내피세포들이 in vitro에서 3차 계대 배양후 더 이상 안되어, 세포분열 능력이 사람에서처럼 제한이 있다는 것을 알았다. 이 각막내피세포에 Adenovirus-12/SV40 hybrid virus로 infection 시킨후 계대배양하여 immortalized cell line을 만들었다. 이들 세포를 워싱턴 대학에서 가톨릭대학교 의과대학 연구실로 가져와 본 연구과제를 수행하였으며 이 세포들이 SV40 large T antigen 양성인 것을 immunocytochemical staining 방법으로 밝혀 내었다. 또한 이 cell line이 Descemet membrane에서 떼어낸 원래의 각막내피세포와 해부학적, 생리학적, 생화학적 특성이 같다는 것을 세포막의 EGF receptor, PDGF receptor와 TGF의 항체를 사용하여 2차년도까지의 연구결과로 증명하였다. 그러나 실제 각막내피세포이식에서 성공률이 전층각막이식술에 못미쳐서 그원인을 2차년도에서 규명하였다. 성공률이 낮은것은 이연구에서 제작한 cell line이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>기능이 저하되어 있고 생성하는 collagen이 type IV가 아닌 type I이 주라는 사실을 증명하면서 설명되었다. 그러므로 virus hybrid를 이용한 주입이 성공율은 매우 높으나 세포의 phenotype를 변화시키는 단점이 있다는 새로운 사실을 알게된 것이다. 그후 3차년도에서 수행했던 lipofectamine을 이용하여 세포내로의 SV40 large T antigen주입은 아직 어느 과학 잡지에도 발표되지 않은 내용으로 비밀유지가 필요하고 in vivo실험에서 성공리에 수행시 Science같은 유명잡지에 발표할수 있는 쾌거라 하겠다. Liposome을 이용한 유전자 주입은 여러 연구소에서 수행중으로 in vitro에서는 성공율이 높으나 in vivo에서는 성공율이 낮은 방법으로 알려져 있다. 그러나 이연구에서 수행하였던 SV40 large T antigen주입은 이항원의 분자량이 커서 아직 다른 연구소에서 시도되지 못하고 있었으며 세포의 증식후 24시간내에 자연

degradation된다는 장점이 있어 성공시에는 그만큼 효과가 크다고 생각된다. 현재 in vitro상에서 각막내피세포에 주입이 성공리에 이루어진것이 Ab-2항체로 확인된 상태로 in vivo실험만 남은 상태이다. 이와 병행하여 herpes virus 로 SV40 large T antigen을 쌍은후 (Trojan horse) 세포로 주입하는 실험이 공동연구자인 Fleming박사팀에서 이루어 지고 있으므로 이과제의 성공적 수행은 의미있는 결과를 양산할 것이다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

\* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

### 1-1) Cell line 구축

방법:

먼저 이송되어 온 super cell을 풀어 세포배양기에서 배양후 계대배양 시키고, 이들 세포의 일 는 액체질소에 다시 보관하고 나머지 세포들은 계속 배양시켰다. 이들 세포들이 SV-40 virus 에 잘 infection되어 있는지 확인하기 위하여 SV40 large T antigen에 대한 항체 Ab-2 (cat #DPO2, Oncogene science)를 사용하여 확인하였다

결과:

SV40 T항원으로 infection된 세포로만 구성되어 있으며 세포핵내에 98%이상 잘 염색되었다 (Fig 1).

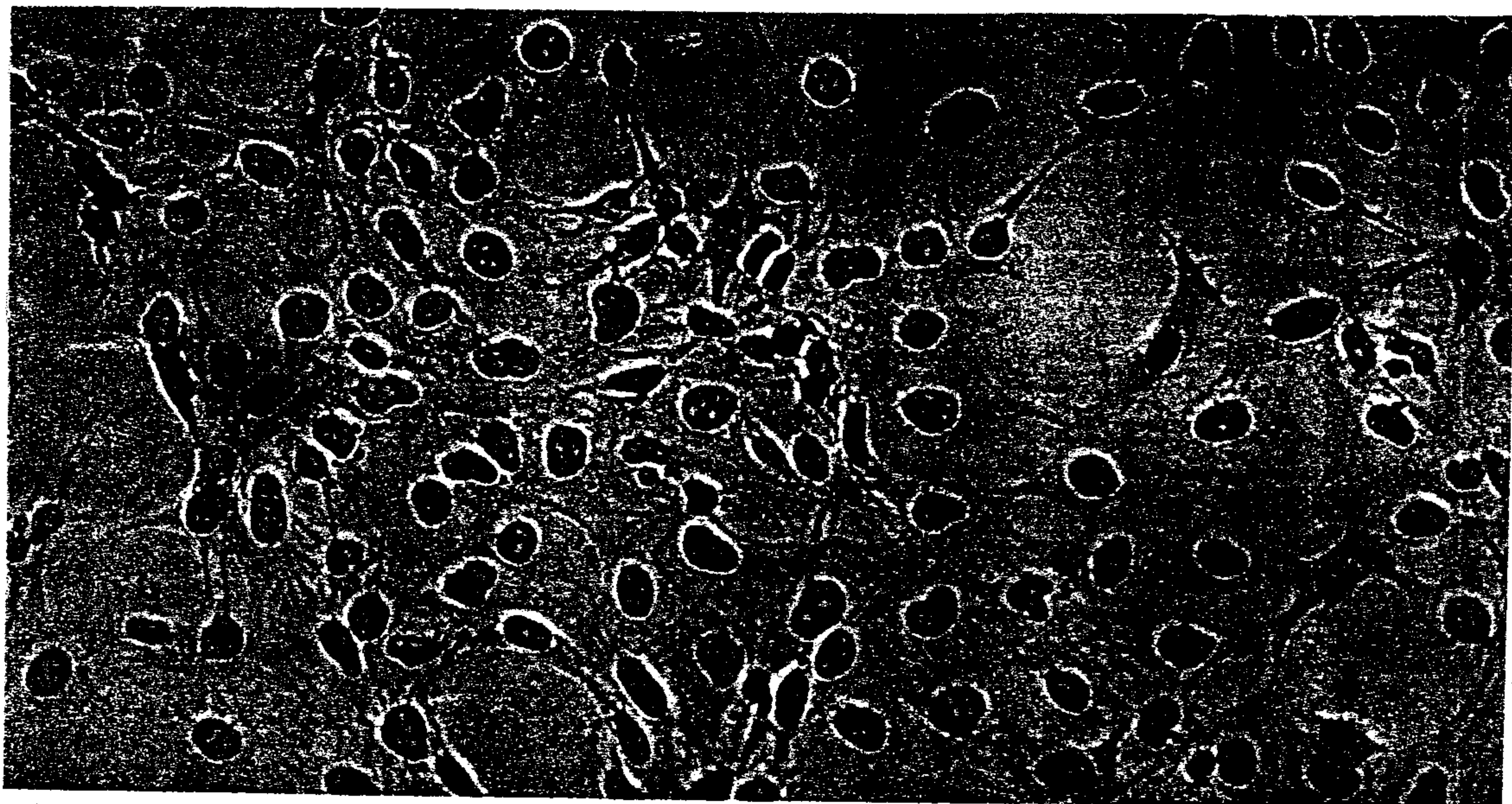


Fig 1. Immunohistochemistry of extended life span murine span murine corneal endothelial cells using a munoclonal antibody specific to the SV40 large T antigen. Extended life span mouse CE cells 20 passages after infection ; 100% of the cells exhibit unclear staining to the SV40 large T antigen. Original magenification, x100.

### 1-2) Supercell의 재생능력 확인

방법:

이들 세포들의 증식능력을 확인하기 위하여 24-well Costar plate(Costar, Cambridge, Ma)에 well당  $1 \times 10^5$  cells의 농도가 되게 분주하고 overnight 시켰다.  $H^3$  thymidine (20 Ci/m mol, Amer sham; Arlington Heights, IL)을  $3 \mu$  Ci 농도로 추가후에 24시간 더 배양하였다. 그리고 PBS로 1차례, cold 5% trichloroacetic acid로 3차례 씻어낸 후 0.25-M NaOH에 녹인 다음 liquid scintillation counting으로 정량분석한다.

결과:

super cell은 계대배양이 거듭되어도 label된 nuclei가 50% 이상 유지되었는데, primary cell에 서는 5%이하로 저하되어 재생능력이 super cell에 있음을 확인하였다(Fig 2).



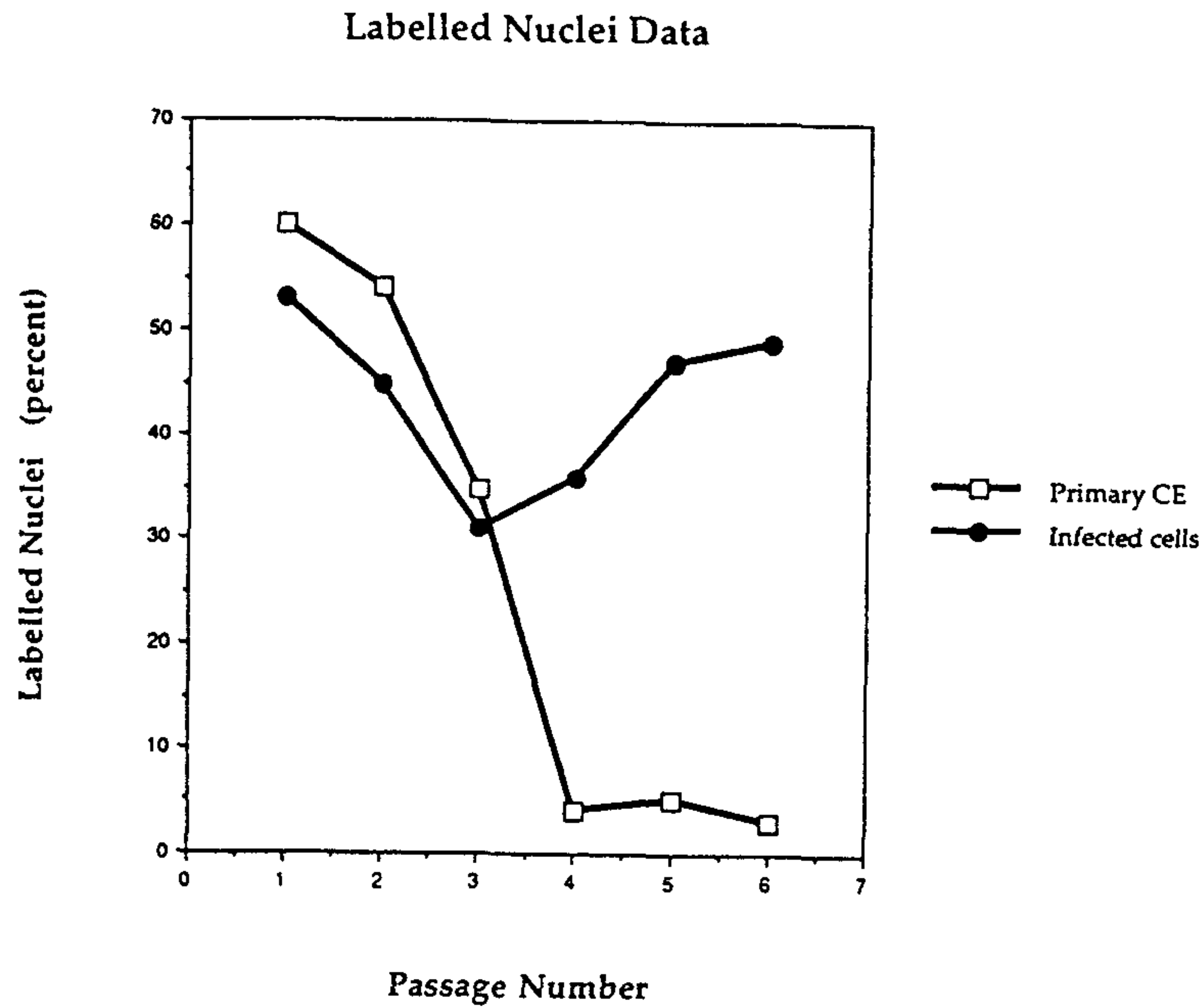


Fig 2. Proliferative capability of the primay murine CE as compared to the extended life span murine CE.  $H^3$  thynidine was added overnight to the cell cultures, and the cells were fixed using 70% ethanol. Labeled nuclei were visualized by adding autoradiography emulsion(Eastman Kodak, Rochester, NY), and images were developed 72 hours later. Data are expressed as the percentage of cells with labeled nuclei, and random fields comprising > 200 cells were counted.

### 1-3) Supercell의 세포막 성장인자 수용체 확인

방법:

Super cell이 각막내피세포의 성장인자수용체가 있는지 확인하기 위하여 면역세포 화학검사를 하였다. 세포들을 70% muthanol로 15분 동안 실온에서 고정후 건조시킨 다음 pH7.6인 50mM Tris buffer에 rehydrate 시켰다. 일차 항체 (epidermal growth factor receptor, oncogene sceince, Uniondale, Ny : TGF- $\beta$ , R & D systems, Minneapolis, MN: PDGFR polyclonal antibody, William LaRouchelle로부터 공급 받음)들을 실온에서 2시간 동안 배양하고 Tris buffer 로 5차례 씻어냈다. Biotinylated된 2차 항체(Dako, Carpinteria, CA)를 30분 동안 추가한 후 다시 씻어내고 50mM Tris buffer에 희석된 peroxidaselabel된 avidin(Dako)을 10분간 추가한 후 씻어냈다. 항체-avidin-biothin-peroxidase 복합체는 3, 3' -diaminobenzidione tetrahydrochloride (DAB)를 1mg/ml 농도로 추가한 후에 관찰되는데 이 반응후에 dH<sub>2</sub>O를 첨가하였다.

결과:

이 super cell은 primary 각막내피세포와 마찬가지로 EGF-receptor, PDGF-receptor, TGF- $\beta$ 에 대해 양성으로 반응해 세포 표면의 수용체에는 아무 변화가 없음을 알 수 있었다(Fig. 3).



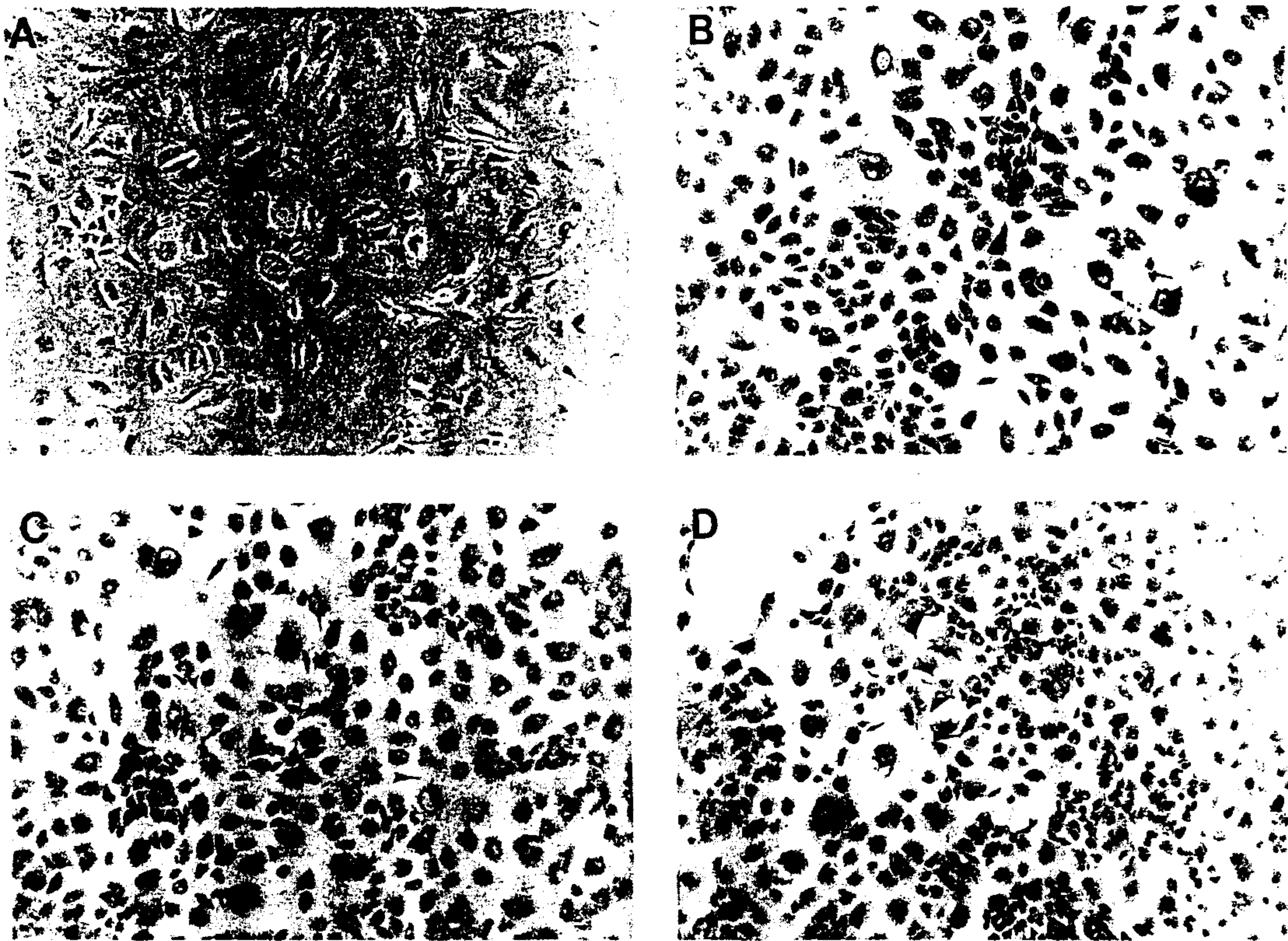


Fig 3. Immunohistochemical analysis of Ad12-Sv40 infected mouse corneal endothelial cells ; passage 10. (A) Control staining using a rabbit IgG. (B) Epidermal growth factor receptor peptide antibody that recognizes the carboxy terminus of the EGFR. (C) Positive staining to the platelet-derived growth factor receptor using a peptide antibody that recognizes both alpha and beta forms of the receptor. (D) Positive immunostaining to a polyclonal antibody specific to transforming growth factor. Primary cells yielded identical patterns as those exhibited using the extended life span cells. Original magnification, x100. EGFR=Epidermal growth factor receptor;PDGFR=platelet-derived growth factor receptor.

#### 1-4) Original 각막내피세포의 제거 및 Super cell의 Descemet막 유착

Super cell의 Descemet막 위에서의 해부학적 구조 및 cell adhesion process를 확인하기 위하여는 먼저 내피세포만 제거된 각막을 준비하여야 한다. 각막내피세포만을 제거하기 위해서 hydrolysis, trypsin이나 collagen 같은 chemical을 이용한 방법과 cotton swab을 이용한 물리적인 방법들이 강구되었다. 이들 방법의 평가는 각막부종, 각막 곡률유지, 각막내피세포 제거 정도와 내피세포 핵의 염색정도 등으로 비교하였다. 그 결과는 다음과 같았다(Table 1).

Hydrolysis는 각막부종이 심하고, 제거된 부분은 완벽하나, 안된 부분도 있었다. Chemicals들은 각막내피세포벽을 완전히 제거시키지 못했고 각막곡률유지가 약했다. 그러므로 이후실험부터는 cotton swab으로 (Dacroswab™, Type 1 [spectrum]) 으로 original 각막내피세포를 제거한후 supercell을 엮고 나서 그 형태학적 변화를 관찰하였다. 각막의 Descemet을 제거하여 완벽한 각막내피세포의 제거 및 super cell의 기저막 생성을 기대하기도 하였으나 in vivo 실험에서 각막이식 후 염증반응이 심하고 전방이 소실되어 이 방법은 더 이상 시도되지 않았다.



Table 1. Removal of original corneal endothelial cells

	Corneal Edema	Loss of Corneal Curvature	Loss of Endothelial Cell Boundary	Loss of Stained Endothelial Cell Nuclei
Hydrolysis	++++	++	60 - 85 %	70 %
Chemical Agents	+	++++	50 - 70 %	70 %
Cotton Swab	-/+	+	> 95 %	> 90 %

++++ : maximum, +++ : severe, ++ : moderage, + : mild

Super cell을 original 각막내피세포가 제거된 Descemet막에 유착시키기 위한 방법으로 laminin, fibronectin과 Tissue & cell adhesive (cell-Tak<sup>®</sup>, #40240)을 이용하였다. 그러나 이들 chemical들이 각막조직을 약하게 만들고 curvature가 유지 안되어 중단하였고 incubator안에서 각막내피세포 쪽을 위로 향하게 하여 super cell을 엮는 방법을 사용하였다.

이들 super cell들을 original 각막내피세포와 쉽게 구별하기 위해서 fluorescein (Zynaxis)로 tagging 시켜서 광학현미경으로 일차 확인하였다.

결과:

적정 세포 농도를 조사한 결과  $5 \times 10^5 / 5 \mu l$ 가 최적임을 알게 되었다.

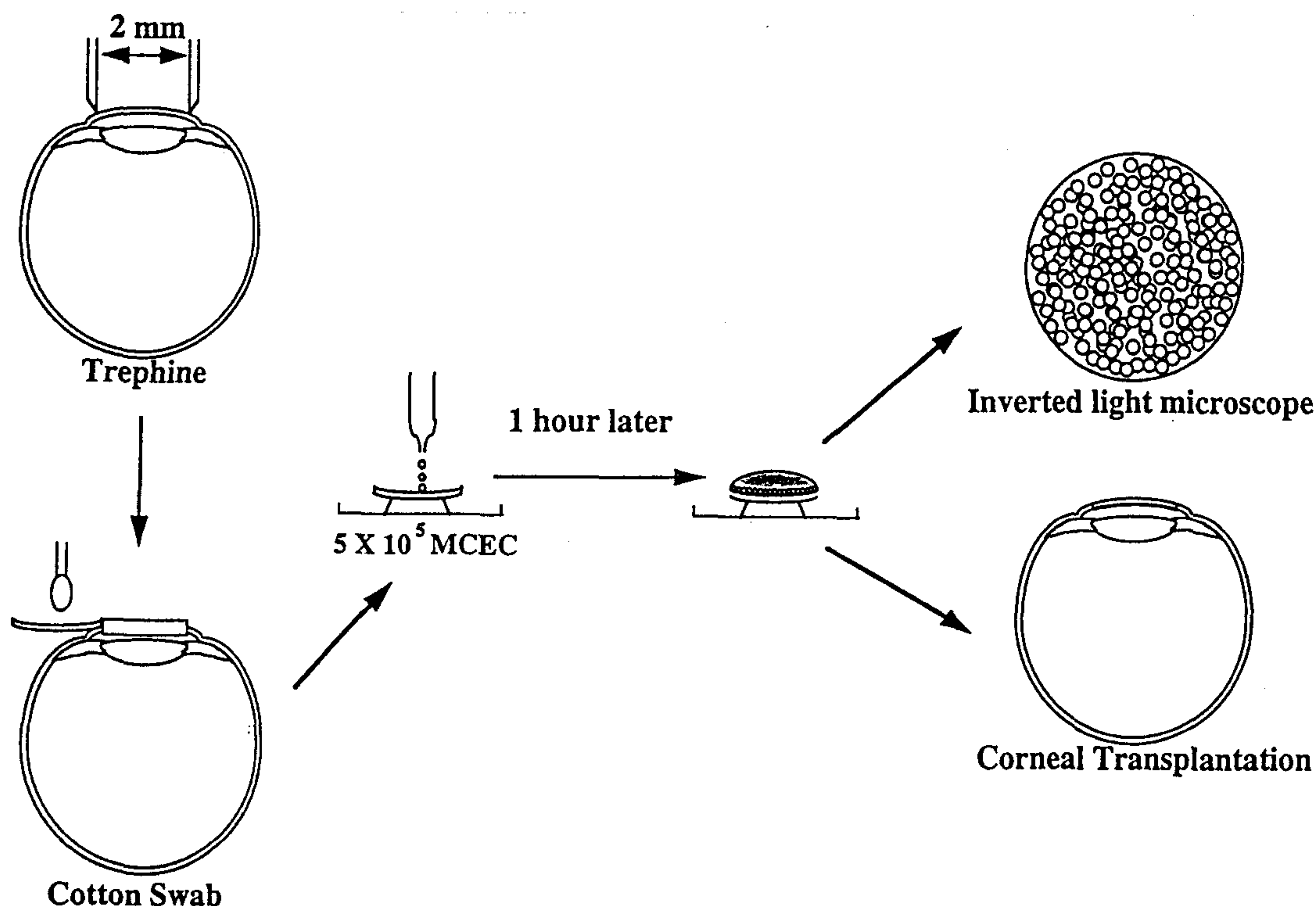


Fig 4. Repopulation of denuded murine Descemet's membrane. Original corneal endothelium was removed with cottonswab by using hinge technique.  $5 \times 10^5 / 5 \mu l$  of supercells were overlaid on denuded Descemet membrane and incubated ofr 1, 2, 6, and 24 hrs in 5%  $CO_2$ , 37°C incubator. Some of these repopulated corneas were examined by inverted light microscope and electron microscope, while others were used for corneal transplantation.



1-5) Descemet 막위에서 각막내피세포 재배치에 대한 광학, 전자 현미경학적 검사 방법:

Descemet 막위에서 재배치된 super cell을 original 각막내피세포와 구별하기 위하여 형광물질로 tagging 시키고 inverted light microscope로 먼저 관찰하여 보았다. 마우스 각막 cup의 capacity는 약 3-4 $\mu$ l로서 각막내피세포 쪽을 위로 향하게 한 후 pipett tip의 중간 부분을 잘라내고 그 위에 얹었다. 그 위에 super cell을 첨가하였는데 그 적정 농도는 5x10<sup>5</sup>cell/5 $\mu$ l였으며 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 1시간, 2시간과 24시간 후에 관찰되었다.

결과:

Super cell은 단층세포구조를 이루며 세포크기와 hexagonal한 형태가 원래의 각막내피세포와 매우 유사하였다. 그리고 1시간내에 Descemet 막위에서 새로운 각막내피세포층을 이루기 위한 기본 과정 즉 유착(adhesion), 확장(expansion)과 결합(cohesion)과정을 볼 수 있었다. 또한 배양 후 2시간에서는 세포분열증상까지 보였으며 24시간에서는 세포밀도가 높은곳에서는 hexagonal한 모양을 보였고, 세포밀도가 낮은곳에서는 세포크기가 커지고, 길어지면서 이주해 가는 양상을 보였다. 2시간에서 세포분열 증상까지 보였으며 24시간에서는 세포밀도가 높은 곳에서는 hexagonal한 모양을 보였고, 세포밀도가 낮은 곳에서는 세포 크기가 커지고, 길어지면서 이주해 가는 양상을 보였다(Fig 5).

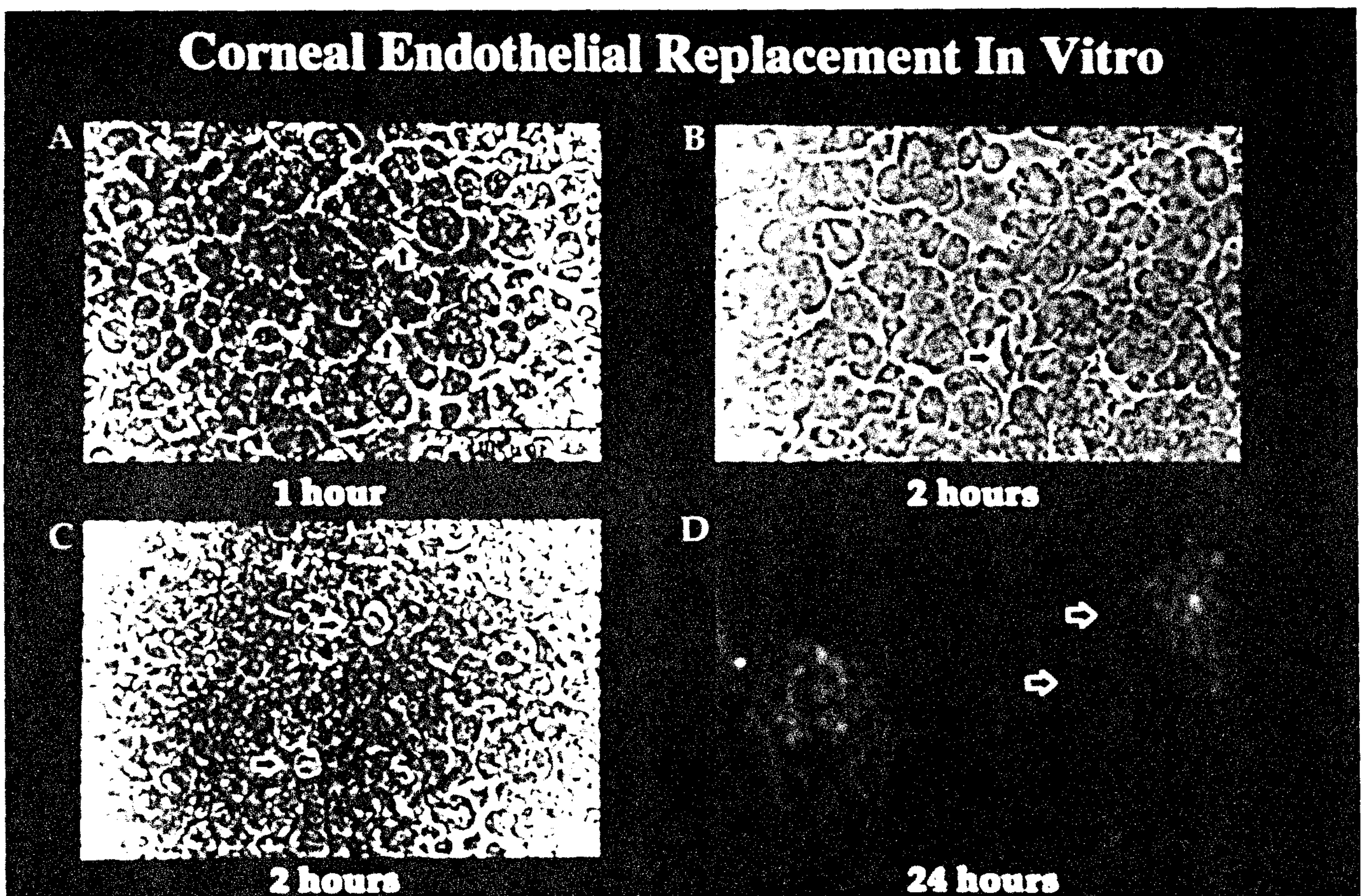


Fig 5. Phase-contrast micrographs of corneal endothelial cell replacement in vitro. The cells were flattened from spherical shape and showed long, thin cytoplasmic process (filopodia)(↑) at 1 hr of incubation(A). The cytoplasmic expansion was prominent(→)(B) and some of the cells showed mitotic pattern(→)(C) at 2hr of incubation.

The cells were elongated and enlarged in low density areas (→), while the cells in high density area kept normal polygonal shape (D).

전자현미경학적 검사도 1시간, 2시간, 6시간과 24시간대에서 시행하였다. 마우스 각막내피세포는 다른 species에서와 마찬가지로 hexagonal shape을 띄면서 microvillae가 많은 양상을



보였고 size는  $\text{mm}^2$  당  $2288.89 \pm 135.45$  cell의 빈도를 나타냈다(Fig 6). 그리고 이들 세포들이 cotton swab으로 제거되었으며 microvillae도 소실되었다.(Fig 7). 배양 1시간후의 세포들은 구형을 이루고 nucleoli가 뚜렷하였으며 이로부터는 변성 양성과 핵 분열양상을 보였다(Fig 8 and 9).

배양후 2시간 때는 경면 전자 현미경 조사상 구형과 방추형 모양의 세포가 표면을 덮고 있었으며, 큰 위성세포가 많은 세포질 확장을 보이며 세포들 사이와 Descemet막 사이에 연결되어 있었다(Fig 10). 단면 조사시에는 Descemet 막에 유착시에는 편평세포 모양을 띄고 있으나, 떨어져 있는 경우는 구형을 띄고 있으며 이들 세포들은 junctional complex에 의해 연결됨을 알 수 있었다(Fig 11). 6시간 배양때는 vacuolated 세포가 Descemet 막에 붙어 있었으며 구형세포들은 Descemet 막에 붙어 있으면서 많은 돌기를 보였다. 세포질 내에는 mitochondria, vacuoles, 핵막, heterochromatin의 clumping과 junctional complex들이 보였다(Fig 12 & 13). 24시간 배양때는 Descemet막에 붙지 못한 구형 세포들이 간혹 보였으나 대부분의 세포들은 크기가 커지고, 편평해지면서 많은 세포돌기를 보였다. 또한 rough endoplasmic reticulum, mitochondria, intracytoplasmic cellular와 junctional complex를 갖는 변성된 세포들이 관찰되었다(Fig 14 & 15).

#### Figure Legend for Fig. 6 - Fig. 15

Fig 6. Scanning(A) and transmission (B) electron microscopic appearance of control with normal endothelium (A, x 1300 ; B, x 1200).

Fig 7. Scanning (A) and transmission (B) electron microscopic appearance of control with from which the endothelium has been removed (A, x200 ; B, x1200).

Fig 8. Low (A) and high power (B) scanning electron microscopic views of cells on posterior surface of cornea at one hour. Many cells are round (arrow) and others are flattened with a spindle or stellate shape (asterisks) (A, x65; B, x1000).

Fig 9. A. Ultrastructural appearance of unattached round cells at one hour. Some have prominent nucleoli (arrow). Others are pale staining and appearing to be undergoing degeneration(arrowhead).

B. Some cells are attached to Descemet's membrane (D), have more than one nucleus and have prominent nucleoli (A, x 2250; B, x 3000)

Fig 10. Scanning electron microscopy at two hours shows round-and spindle-shaped cells superficially (arrows) and larger stellate-shaped cells (asterisks) with numerous cytoplasmic extensions that are attached to one another and to Descemet's membrane (A, x 1000 ; B, x 2000)

Fig 11. Transmission electron micrograph at two hours illustrates the unattached round cells (arrow) and attached flattened cells. Some cells are joined by junctional complexes (circled and inset) ( x5,900 ; inset, x 40,000)

Fig 12. Area at six hours where mildly vacuolated cells are flattened and attached to Descemet's membrane (x 6,000)

Fig 13. Area at six hours where some cells (asterisks) are flattened and attached to Descemet's membrane (D). Other more round cells are also attached to Descemet's membrane or have processes, (arrow) extending to Descemet's membrane. These cells have numerous mitochondria (arrowheads), some vacuoles, convoluted nuclear membrane, clumping of heterochromatin and an occasional junctional complexes (circle and inset)(x 8,100 ; inset, x 13,400)

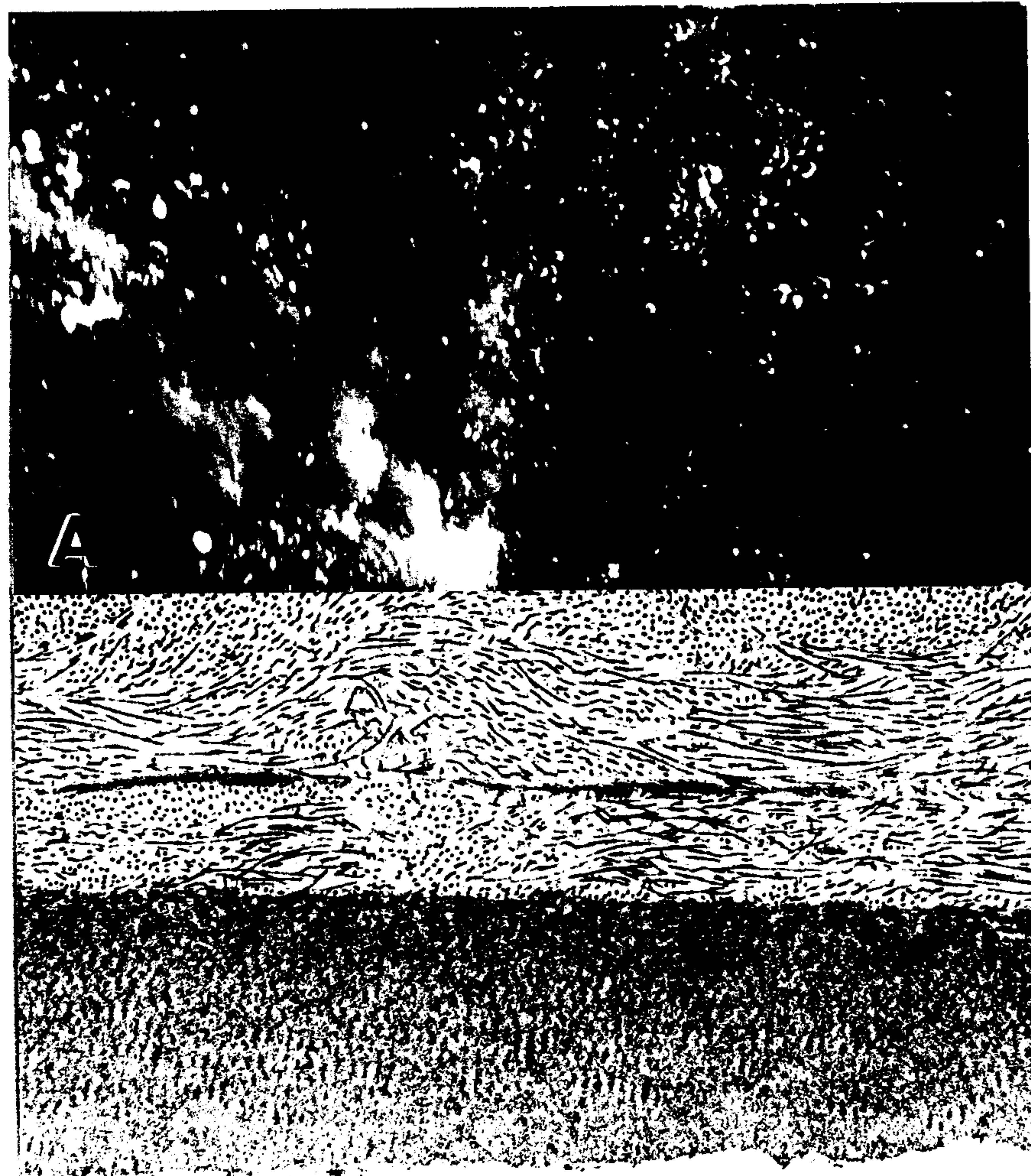
Fig 14. A. Scanning electron microscopic appearance of posterior surface of the cornea





**B**

Fig. 6



**B**

Fig. 7



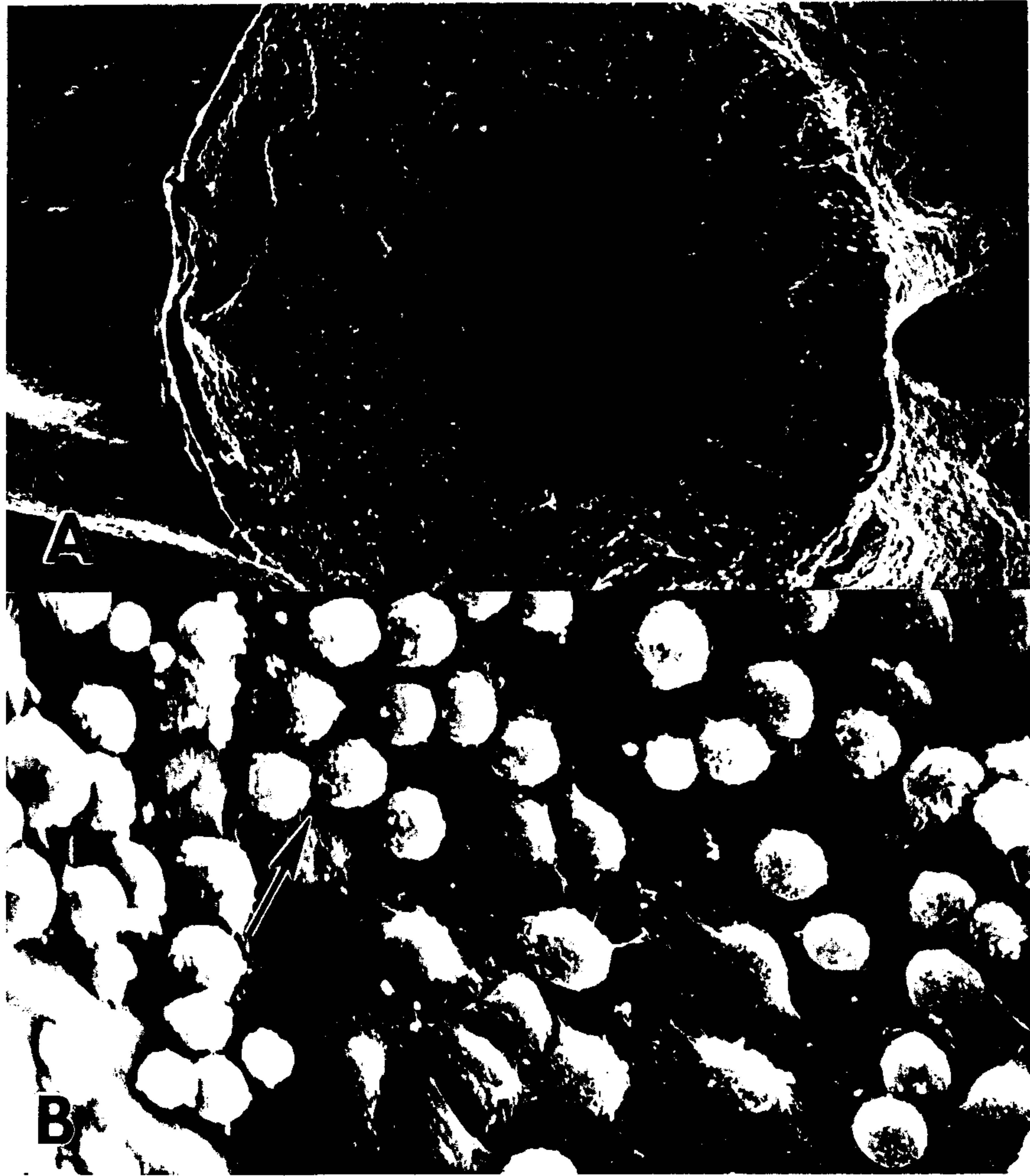


Fig. 8

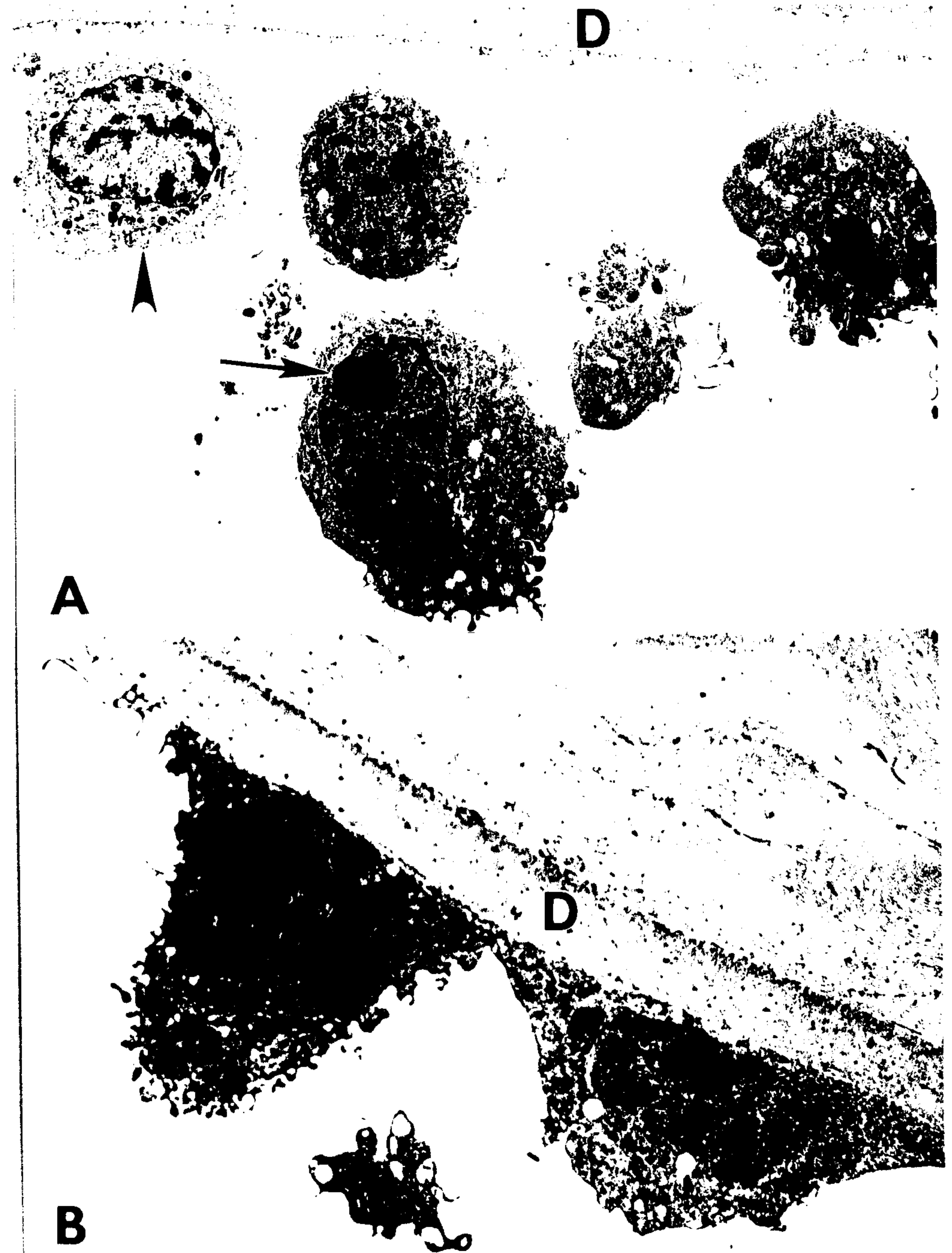


Fig. 9



Fig. 10



Fig. 11



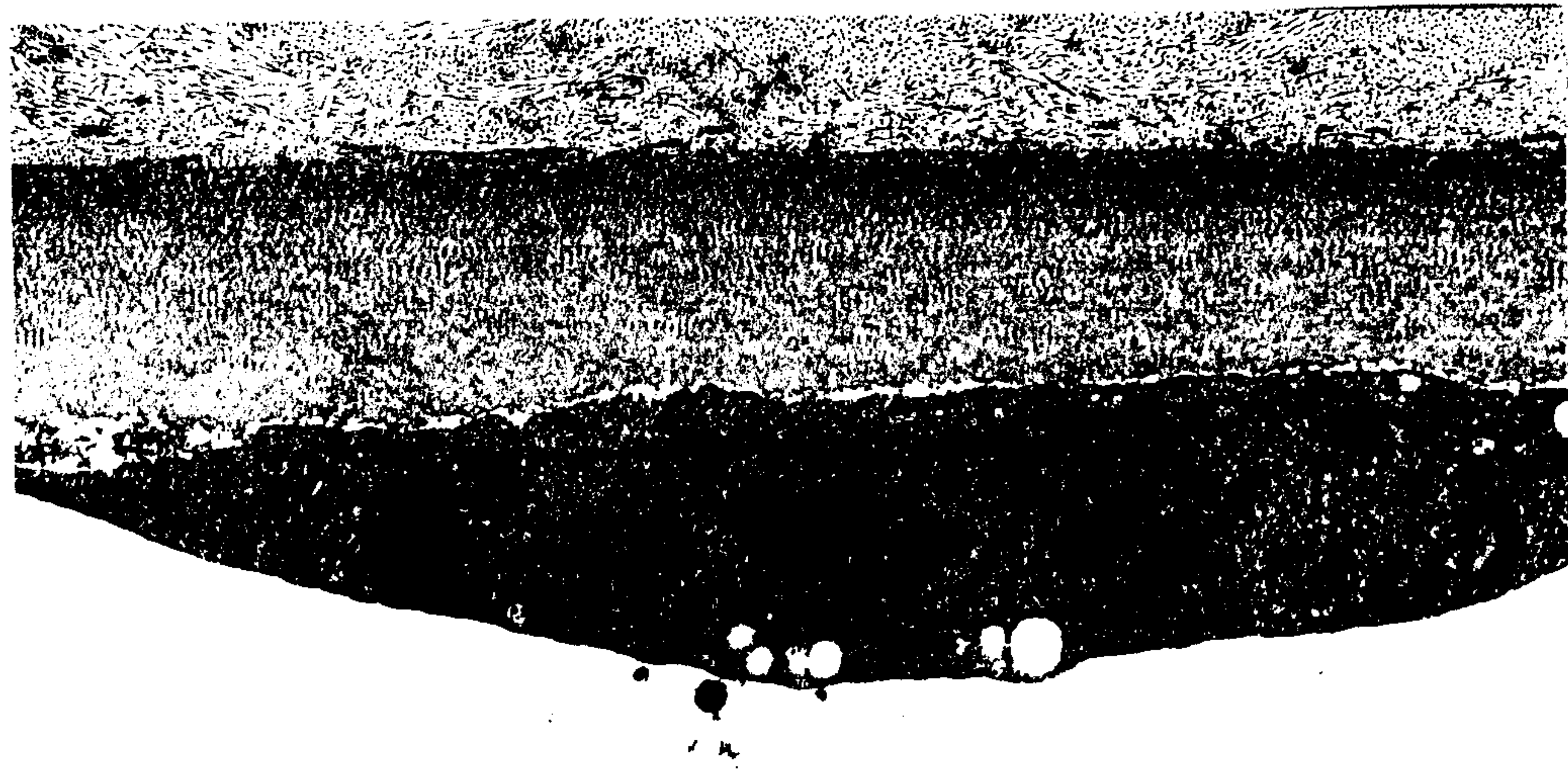


Fig. 12



Fig. 13





Fig. 14

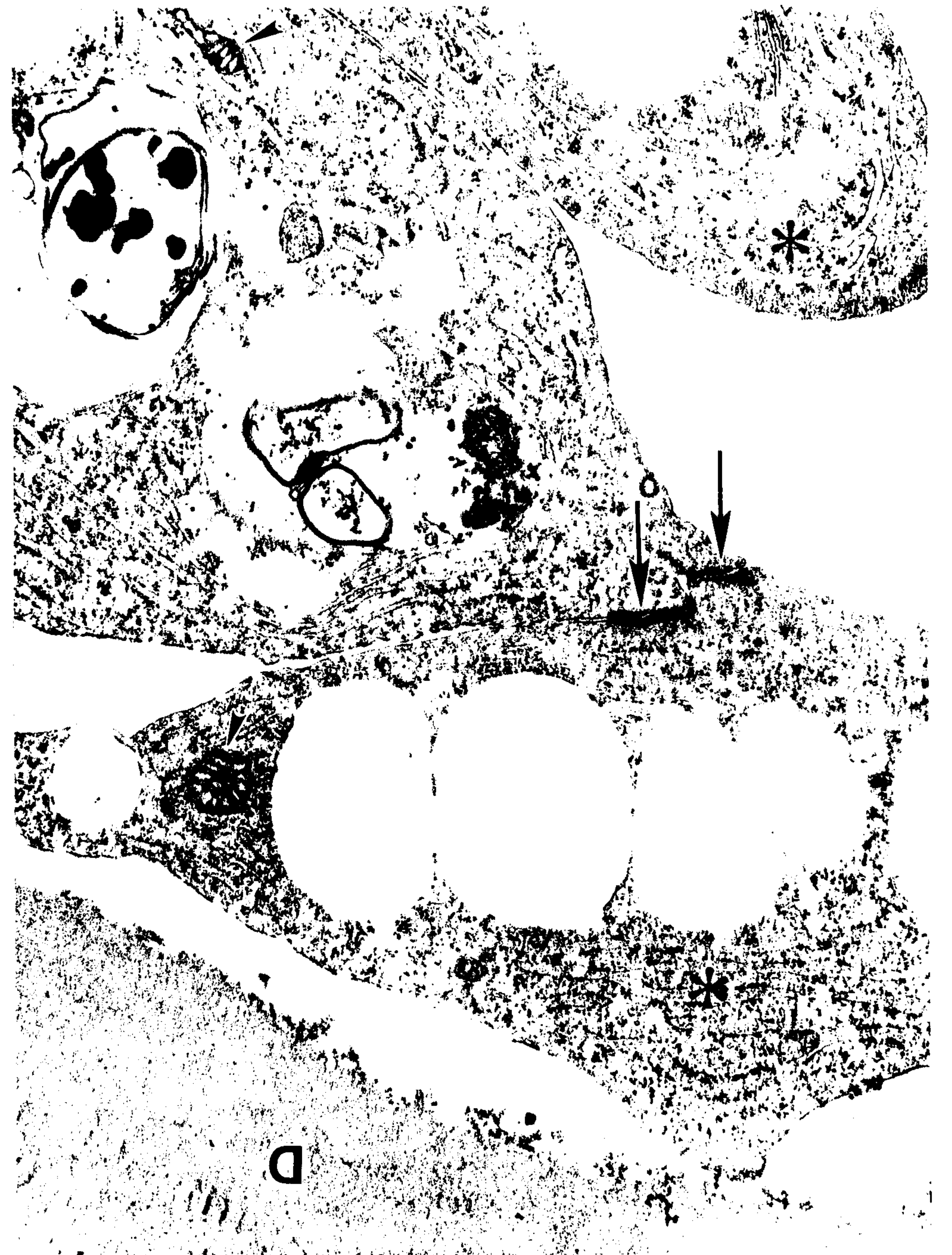


Fig. 15



of 24 hours.

B. A few small unattached round cells (arrows) are present. Most of the cells are large, flattened, have numerous cytoplasmic processes (asterisks) and are overlapping (A, x55 ; B, x500 ; C, x 2000)

Fig 15. Area at 24 hours with vacuolated, partially degenerated cells that have rough endoplasmic reticulum (asterisks), mitochondria (arrowheads), intracytoplasmic cellular debris and junctional complexes (arrows)(D-Desmoglein's membrane) (x 24,000).

### 1-6) $^3\text{H}$ ] Ouabain binding Assay

방법:

SV-40로 계대배양이 가능하게 된 murine corneal endothelial cell line인 super cell과 primary culture이면서도 계대배양이 비교적 용이한 Bovine corneal cell, stromal, corneal endothelial cell과 lens epithelial cell들의  $^3\text{H}$ ] - Ouabain binding Assay를 실행하여  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase의 pumping 작용이 immortalized cell line에서도 충분한 역할을 하는지를 알아보았다.

먼저 40-50%와 80-90% confluent된 농도의 cell들을 24well에 준비하고 2번 binding media (20mM HEPES pH7.4, 1mg/ml BSA : in  $\text{K}^+$ -free Ringer's solution : NaCl, 6.801g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.135g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.15g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.103g;  $\text{NaHCO}_3$ , 2.453g; glucose, 0.903g/ℓ)로 washing해 주었다.

Binding media에서 2시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 incubation 한 후 fresh한 binding media와  $1.25 \times 10^{-8}$ 의  $^3\text{H}$ ] -ouabain을 넣어주었다. Nonspecific binding을 알기위해 1mM의 cold ouabain을 Hot Ouabain과 넣고 배양하였다. 또  $\text{K}^+$ 의 ouabain binding 억제 효과를 알기위해 16mM의 KCl을 Hot ouabain과 함께 배양하였다. 2시간 배양후 3번 washing media(1% FBS, 20mM HEPES in Ringer's solution)로 남아있는 non-binding  $^3\text{H}$ ] -ouabain을 씻어낸 후 1ml의 Lysis media (10% Triton X-100, 20mM HEPES in Ringer's solution)를 넣고 30분 동안 실온에서 incubation 하였다. cell이 Lysis 되도록 여러번 pipetting한 후 3ml의 scintillation fluid에 넣고  $\beta$ -counter로 radioactivity를 측정하였다.

결과:

super cell과 Bovine corneal epithelial cell (CEP), corneal endothelial cell (CEN), stromal cell, lens epithelial cell (LEP)등에 대해 Ouabain binding assay의 결과는 각막내피와 실질세포들이 외피 세포와 수정체 상피세포에 비해 binding양이 많으며, super cell에서의 binding은 극히 낮았다(Fig 16). 이들 binding assay에 대한 검정은 다른 실험에서 cold ouabain과 KCl로 확인한 결과 각각 56%과 43%의 Block 소견을 보였다. super cell의 binding assay가 극히 낮게 나타난 것은 gene regulation이 immortalizing 과정 중에 변형이 된 것으로 생각된다.

## 3-H ouabain binding

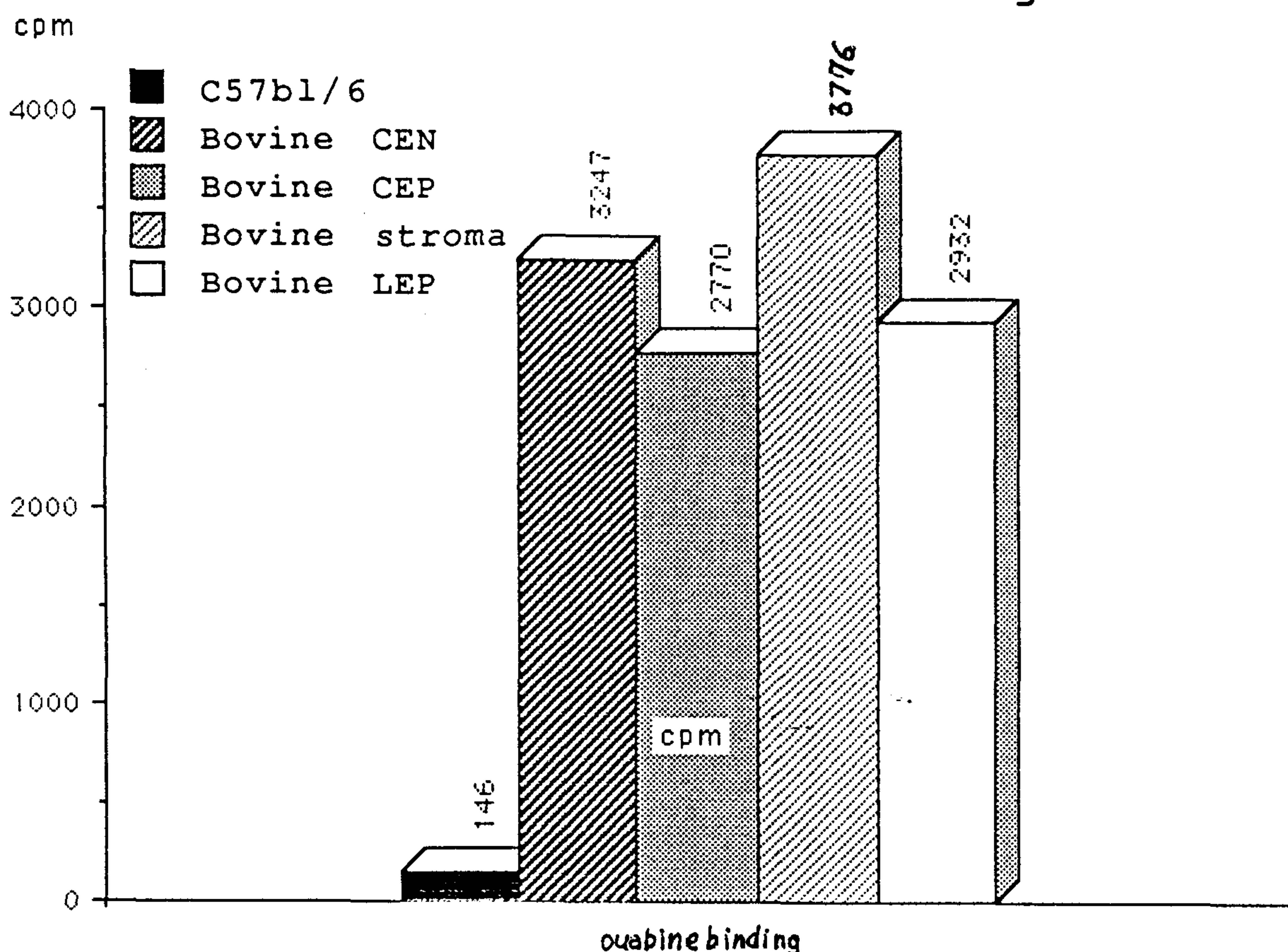


Fig 16. [<sup>3</sup>H] Ouabain binding assay. [<sup>3</sup>H] Ouabain bindings of Bovine corneal endothelial cells and stromal cells were higher than those of corneal epithelial cells and lens epithelial cells. [<sup>3</sup>H] Ouabain binding of wuper cells was about 1/20 of those of other cells.

### 2-1) 각막내피세포이식

#### 방법:

본 대학에 있는 동물실험에서는 Kist나 국립 보건원에서 구입한 Balb/c, C57BL/6, NIH 암놈 마우스를 사용하였다. 본래의 각막내피세포가 제거된 Donor용 각막에 SV-40 virus로 계대배양이 가능하게 만든 각막내피세포를 붙혀 각막이식을 한다. 각막이식은 Donor와 Recipient 마우스를 phenobarbital 50mg/kg 농도로 복강내 주입하여 마취시킨 후 2mm 직경의 trephine(E 2790, Storz, St. Louis, MO)과 vannas가위 (Storz, St. Louis)를 사용하여 각막을 떼어낸다. Donor 각막을 즉시 옮겨와 11-Onylon(70 $\mu$ m 지름의 needle, Sharp-point, Vanguard, Houston, Tx)으로 12바늘 꼬맨다. 염증예방 항생제 연고로는 자극이 적은 Ocumycin(Pharmafair Hauppauge, NY)을 사용하여 실밥을 제거할 수술후 7일째까지 1일 1회 치료한다. 실밥 제거시 전방출혈 또는 소실, 심한 염증, 백내장, 혼탁 score가 4이상인 경우는 제외시킨다. 그후 거부반응 검사는 dissecting 현미경이나 세극등 현미경으로 1주일 간격으로 하며 2명의 검사자가 각기 각막 혼탁정도와 신생혈관 점수를 기술한다(Table 2).



Table 2. Clinical scoring system for orthotopic corneal grafts

Score	Clinical Appearance
Opacity :	
0	Clear graft
1	Minimal, superficial opacity not involving corneal stroma
2	Minimal to moderate opacity including corneal stroma
3	Moderate stromal opacity, where pupil is visible and iris obscured
4	Intense stromal opacity, where only outline of pupil is visible
5	Severe stromal opacity, where pupil is not visible
Neovascularization	
0	No neovascularization
1	Vessels in < 50% of recipient graft bed only
2	Vessels in > 50% of recipient graft bed only
3	Vessels in < 50% of recipient-graft border
4	Vessels in > 50% of recipient-graft border
5	Vessels in < 50% of peripheral graft stroma
6	Vessels in > 50% of peripheral graft stroma
7	Vessels in 50% of central graft stroma
8	Vessels in > 50% of central graft stroma

관찰기간중 혼탁점수가 2이상인 경우에 거부반응이 있다고 간주하며, 8주까지 추적 관찰하고 그 이후 혼탁점수가 2이상이면 완전거부로 간주한다.

결과:

각막이식시 supercell이 전방내로 떨어지는 것을 방지하기위하여 점탄물질인 Healon을 사용해야하며 (다른 마우스각막이식시에는 점탄물질이 필요없음) supercell이 없는 경우에도 술후 약1주일까지는 각막내피세포가 이식된경우와 clinical score가 차이가없었다. 그러나 술후 2주일부터 큰차이를 보여 각막내피세포가 이식된경우에는 혼탁점수가 2이하를 보인반면 각막내피세포가 없이 각막실질과 상피세포만이 이식된경우에는 4이상의 혼탁점수를 나타내었다(figure 16). 각막내피세포이식후 supercell이 각막의 Descemet막에 부착되어있는지 확인한 결과 Fluorescein이 tagging되어있는 세포들이 1주일후에도 관찰되었다 (figure 17). 그후 이식된각막은 투명성을 나타내어 술후 2주째와 4주째에 홍체가 각막을 통하여 관찰되었다.

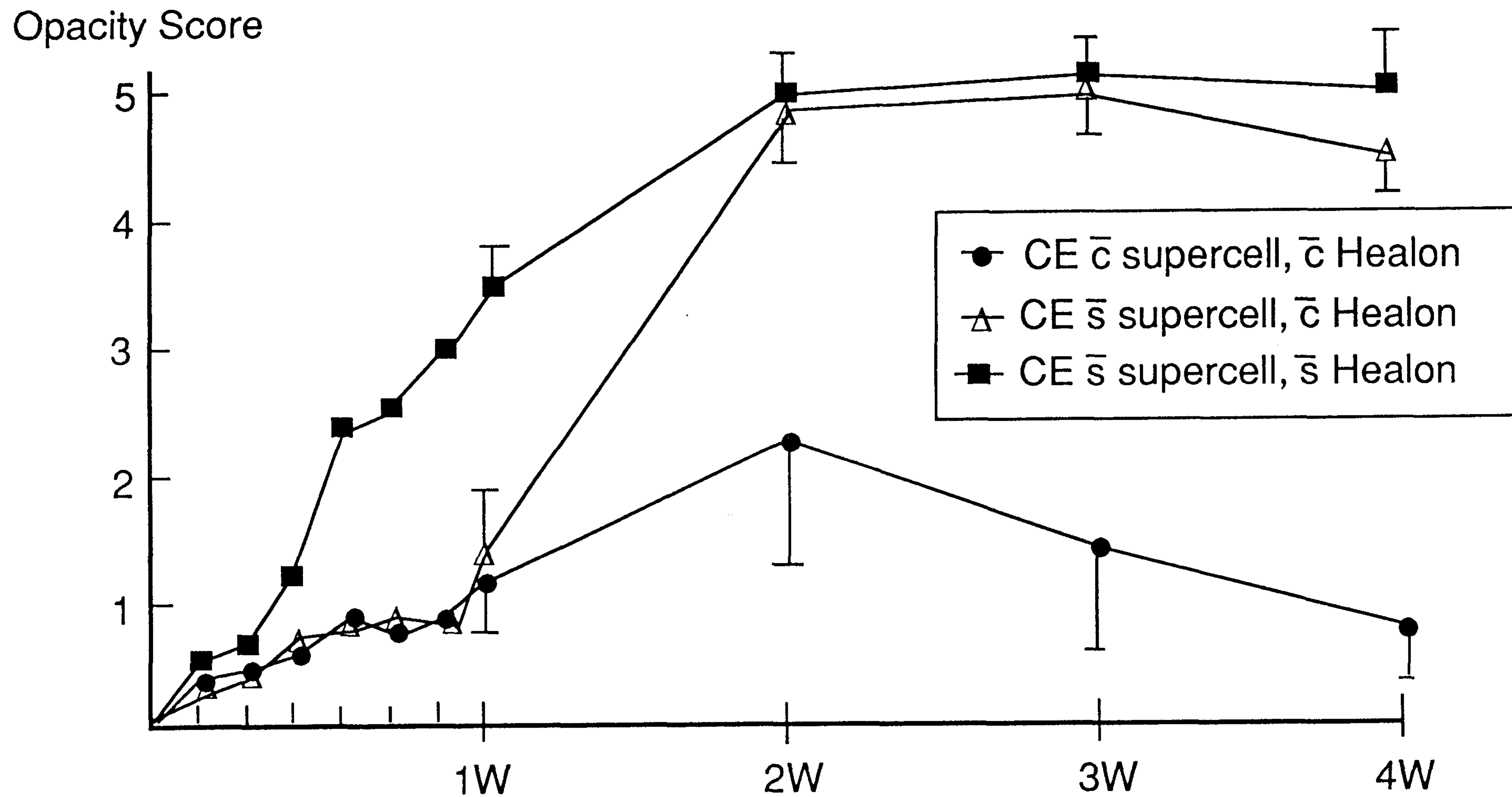
2-2) 각막이식후 면역검사

방법:

세포독성 검사인 cytotoxic lymphocyte(CTL) 반응과 과민반 delayed hypersensitivity (DTH)을 이용하여 2,3,4주에 각각 검사하였다.

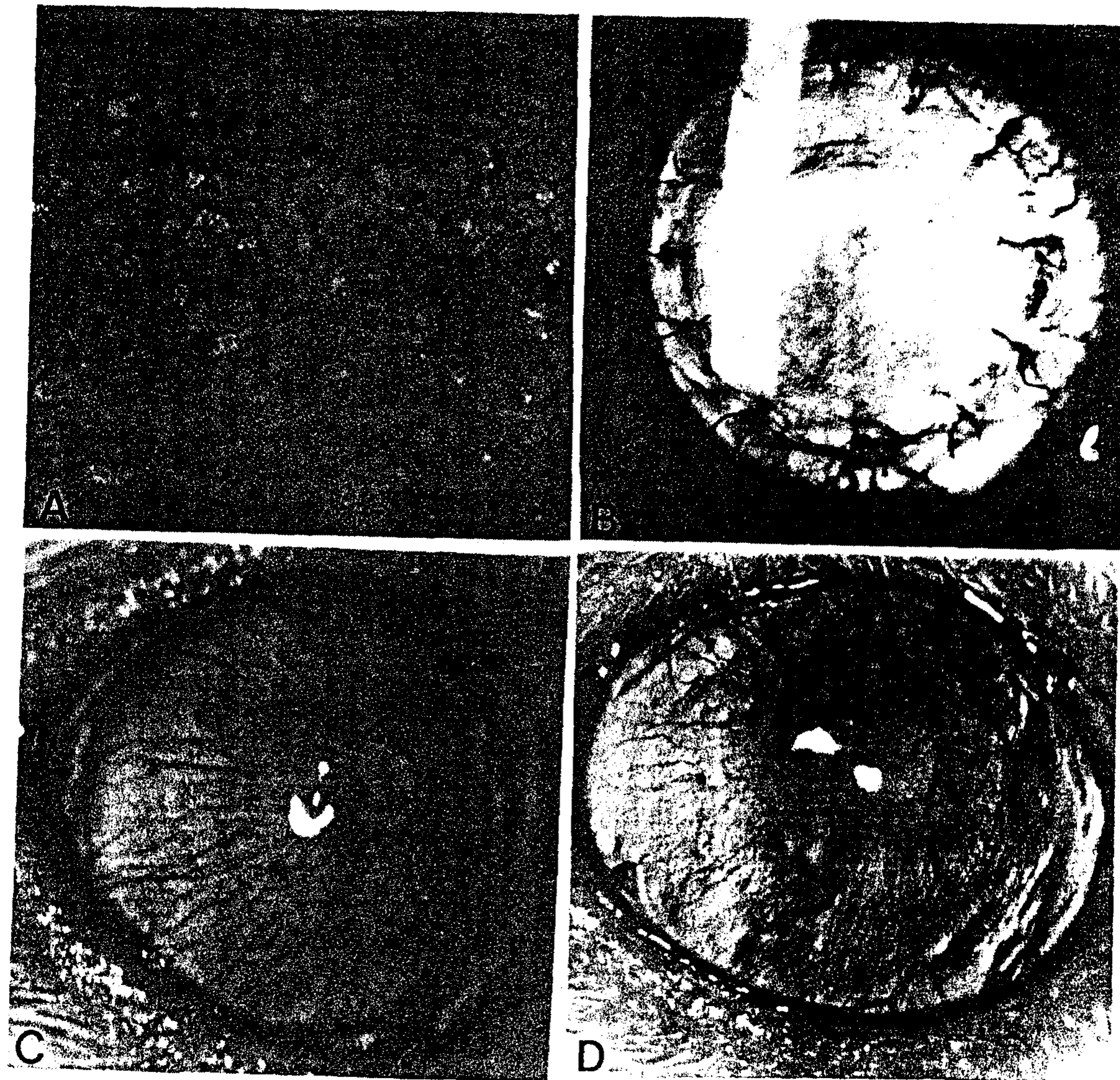
CTL 검사법은 Recipient 동물인 Balb/c 비장세포를 10% FBS, 2.0 mL-glutamine, 5x10<sup>-5</sup>M beta-mercaptoethanol, 10mM HEPES, 100 IU penicillin, 100µg streptomycin/ml이 첨가된 DMEM에 2.5x10<sup>6</sup> cell/ml 농도로 준비한다.

이들세포를 2,000 Rad 처치한 C57BL/6 q1wkdtpvh(1.25x10<sup>6</sup>/ml)와 같이 4일간 배양 한다. C57BL/6 derived EL-4(H-2<sup>b</sup>) tpvhfmmf allogeneic target으로, DBA/2 derived P815(H-2<sup>d</sup>) mastocytoma 세포를 syngeneic target으로 하여 상기의 배양액에 5x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 준비한 후 10<sup>4</sup> cells/µl 농도로 <sup>51</sup>Cr(Amersham, Arlington Heights, IL)과 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 100% 습도 상태인 Incubator서 4시간 배양한다.



**Fig. 16** Clinical Course of Murine Corneal Endothelial Cell Transplantation





**Fig. 17** Clinical pictures of cornea after corneal endothelial cell (CEN) transplantation. Implanted supercells on the Decemet's membrane observed with fluorescein inverted light microscope one week after CEN transplantation (A), photoslit lamp biomicroscopic views of the cornea one week (B), one month (C), and two months (D) after CEN transplantation.



이 96well plate를 원심분리(10분, 1000 x g)한 후 상층액 100 $\mu$ l을 채취하여 gamma counter (Gamma 5500B, Beckman, Fullerton, CA)로  $^{51}\text{Cr}$ 을 잰다.

$$\% \text{ Specific } ^{51}\text{Cr release} = (\text{실험배출 cpm} - \text{자연배출 cpm}) / (\text{최대배출 cpm} - \text{자연배출 cpm}) \times 100 \pm \text{S.E.M.}$$

$^{51}\text{Cr}$  최대배출은  $^{51}\text{Cr}$ 으로 label된 target세포를 10% Triton X-100(sigma, St. Louis, MO)과 4시간 배양후 나오는 양으로 적정된다.

DTH 검사방법은 항원으로 자극 후 footpad의 두께의 변화를 재서 한다. 각막이식된 Balb/c 마우스에다 3000 Rad로 처치된 C57BL/6 마우스 비장 세포를  $1 \times 10^7 / 30 \mu\text{l}$  농도 우측 foot pad에다 피하주입하고, control로는 같은 조건으로 처치된 Balb/c나 NIH (H-2<sup>d</sup>) 비장세포를 주입한다. foot pad의 두께는 engineer's micrometer (Mitutoyo corp, Tokyo, Japan)으로 주입전, 주입후 24시간, 48시간 잰다.

Foot pad의 두께 변화 계산은 Experimental swelling(우측발의 24시간 또는 48시간때의 두께 - 우측발의 주입전 두께) - control swelling(좌측발의 24시간 또는 48시간 때의 두께 - 좌측발의 주입전 두께)  $\times 10^{-3}$  inches  $\pm$  S.E.M.

결과:

각막의 allograft에서 CTL 반응은 syngeneic graft보다 유의있는 차이를 보였다. 그러나 allograft중 면역거부반응이 있는 경우 (각막혼탁점수가 2이상)와 면역거부반응이 없이 염증 반응만있는 경우를 비교한 결과 면역반응이있는 경우가 일반적으로 높았으나 통계적의의는 없었다 (figure 18). 그에반하여 DTH반응은 술후 2주째부터 4주째까지 면역거부반응이 있는 경우가 없는 경우보다 통계적의의가 있게 높았다 (figure 19). 결론적으로 DTH반응이 CTL반응보다 각막이식에서 더 의미있는 면역반응으로 확인되었다.

### 2-3) Supercell의 전방주입 후 안전성 검사 및 ACAID 유도

방법:

Supercell을 전방내에 5 $\mu$ 당  $1 \times 10^4$  cell,  $5 \times 10^4$  cell,  $1 \times 10^5$  cell,  $5 \times 10^5$ 과  $1 \times 10^6$  cell의 농도를 조절한후 주입한다. 주입후, 1주, 2주, 3주, 4주와 8주에 안구를 적출한후 large T-Ag에 대한 항체를 이용하여 면역화학검사를 시행하였다. 그럼으로서 이들 세포가 안구내에서 증식 또는 섬유주를 통하여 배출되어가는 과정을 조사하였다. ACAID( anterior chamber associated immune divation)로 면역학적 특성을 갖고 있는 전방(anterior chamber)이 이식하고자 하는 각막내피세포층과 접하고 있다. 그러므로 이식된 cell line의 항원성 인식이 낮게 되고, 이들 세포는 기능을 잘 하고 버티리라 예상된다. 그러나 이의 확인을 위하여 전방에 major and minor histocompatibility가 다른 마우스의 임파구를 2000 rad로 약화시키고  $1 \times 10^4$  cell/ $4 \mu\text{l}$  등의 여러농도로 주입한 후 위에 서술한 방법대로 DTH 반응을 조사하여 적정농도를 확인하였다.

결과:

전방에 주입된 supercell들은 1일째 가장많고 점차숫자가 감소하였으나 분포되는 양상은 1-2일째는 전방에 산재되어있다가 3일-1주일째는 각막내피쪽과 수정체막쪽으로 이동하여 거의 일열로 존재하는 것을 관찰할수 있었다. ACAID를 유도하기위한 임파구의 농도는  $1 \times 10^6$  가 되어야한다는 것을 확인할수있었다. 그이하의 농도에서는 오히려 면역반응을 자극하여 각막이식거부반응을 심하게 일으켰다 (table 3).

### 2-4) Super cell의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pumping 작용의 재확인

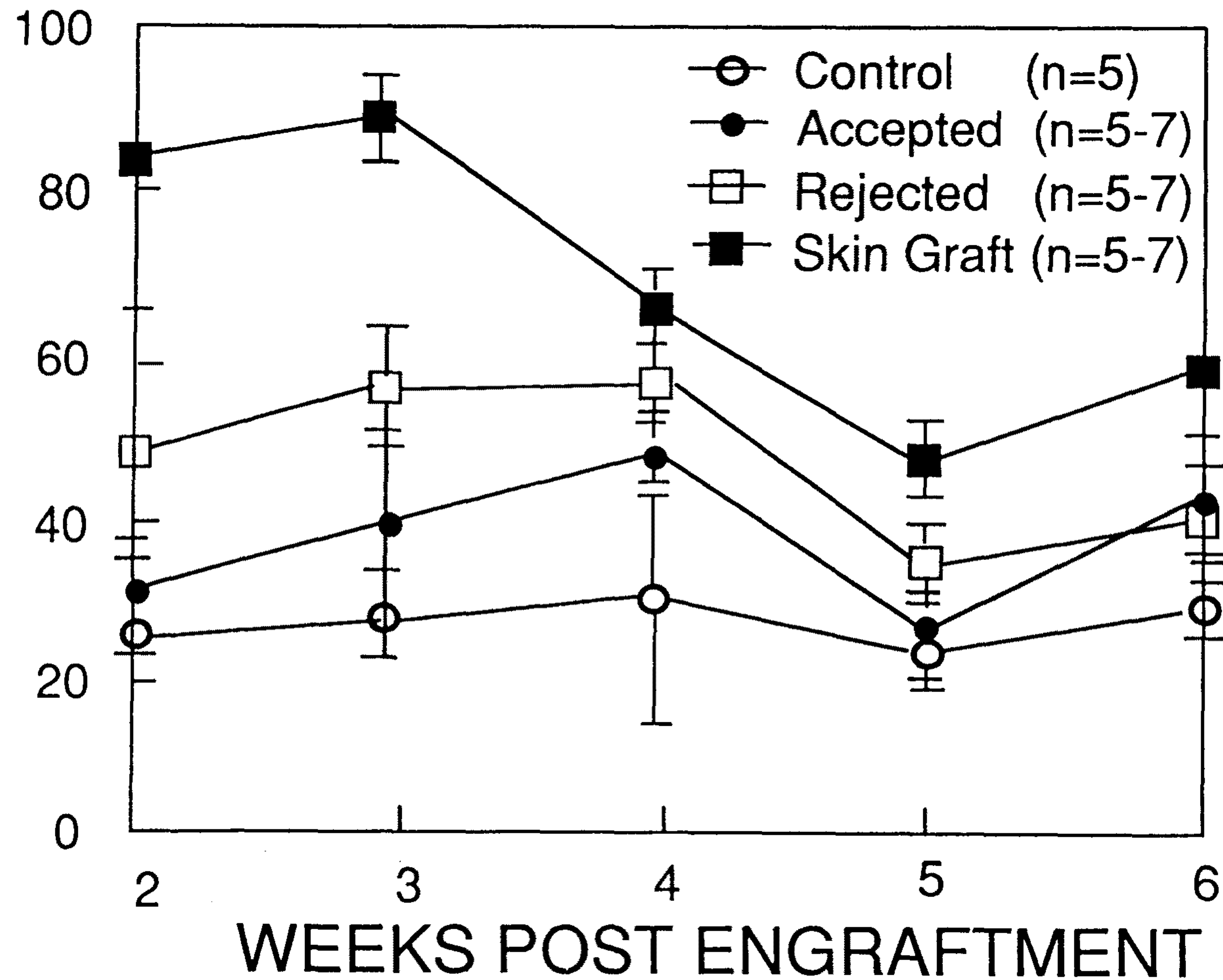
방법:

마우스각막내피세포의 일차배양세포를 control로 하여 super cell의  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  pumping 작용에 대해 ouabain test를 다시 시행하였다.

결과:



# PERCENT SPECIFIC LYSIS



**Fig. 18** Secondary CTL response induced in orthotopic corneal and skin Allografts

FOOTPAD SWELLING  
(X 10<sup>-3</sup> inches)

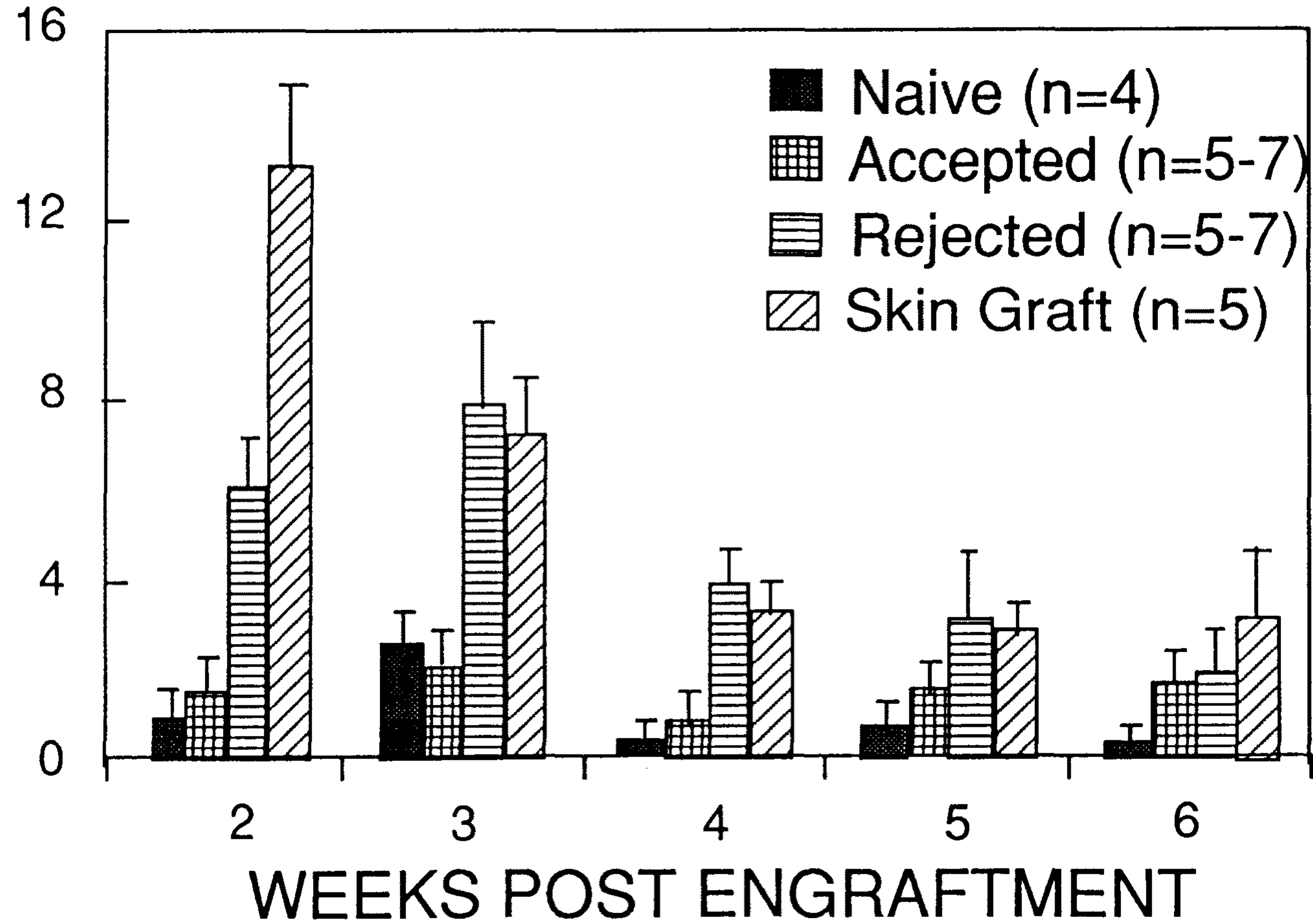


Fig. 19 Delayed type hypersensitivity at 24 hrs



Table 3. Rejection Rate and Opacity Score in Murine Corneal Transplantation following Lymphocyte Injection into Anterior Chamber

Group		Rejection Rate	Ave. Opacity Score
Control B6		67% (6/9)	2.8 ± 0.24
Control B10.D2		62.5% (5/8)	2.9 ± 0.34
Control C.B10-H-2 <sup>b</sup>		70% (7/10)	2.6 ± 0.4
Injected with B10.D2 (5x10 <sup>5</sup> )			
Grafted with B10		100% (8/8)	3.5 ± 0.2
Grafted with B10.D2		75% (6/8)	2.9 ± 0.36
Injected with C.B10-H-2 <sup>b</sup> (1x10 <sup>5</sup> )			
Grafted with B6	(50%)	50% (4/8)	2.7 ± 0.35
Graft with C.B 10-H-2 <sup>b</sup>	(25%)	75% (6/8)	3.2 ± 0.35
Injected with B6 (4x10 <sup>5</sup> )			
Graft with B6		100% (8/8)	3.5 ± 0.2
Injection into A.C.			

supercell의 ouabain의 tritiated thymidine 배출양이 정상 각막내피세포의 배출양에 비하여 현저히 적음을 알수있었다. 이는 supercell의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumping작용이 정상 각막내피세포에비해 떨어짐을 의미한다. 이상의결과가 SV-40 virus hybrid의 작용인지를 확인하기 위하여 사람수정체상피세포에 SV-40 virus hybrid로 transfection시켜 만든 B-3 cell line으로도 조사한 결과 정상 수정체상피세포보다 생리적 기능이 감소함을 알수 있었다 (figure 20).

## 2-5) Immunoblotting for Collagen Synthesis

방법:

Adeno virus-SV40 hybrid로 immortalized된 C57bl/6 murine corneal Endothelial cell 을 각각 10% FBSdhk 20% FBS를 포함하는 D-MEM에서 confluent하게 키운 후 media만 따로 분리해 30%로 포함된 ammonium sulfate로 농축하였다. cell layer는 긁어낸 후 Buffer B(0.15M Nacl, 0.05M Tris-Hcl, pH 7.4, 0.1% Triton x-100)에서 균질화 시킨 후 4°C에서 24시간 동안 추출하였다. 단백질 농도를 결정한 후 10% polyacrylamide gel을 영동하고 단백질을 nitrocellulose filter에 옮기고 0.05% Triton x-100를 포함하는 PBS에서 washing해 준다. 같은 buffer에 0.5% dry milk 를 녹여 남아 있는 accessible sites을 block한 후 3시간동안 1:50으로 희석된 1차 antibody를 반응시키고 washing 하였다. horseradish peroxidaseconjugated 2차 antibody를 1:500으로 희석한 후 2시간 동안 Incubation하고 washing하였다. 마지막 단계로 membrane을 hydrogen peroxide(10 $\mu$ l/ 10ml DAB)를 포함하는 Diaminobenzoic acid (DAB, 1mg/ml PBS)로 Incubate 하였다.

이과정은 super cell이 immortalizing 과정 중이나 계대배양 과정 중 gene regulation이 바뀌었거나 생성되는 collagen 종류가 바뀌는지에 대해 Western blot으로 조사하는 것이다.

Super cell이 생성하는 collagen 종류가 type IV에서 type I 으로 바뀌어졌다면 각막내피세포의 일차배양을 culture flask에 collagen coating후 또는 bare Descemet 막위에서 하는 법으로 바꾼 다음 SV-40 virus hybrid로 형질 변형시킬 것이다.

결과:

NIH, Balb/c와 C57Bl/6의 3종류 supercell과 primary culture한 마우스 각막내피세포에서 상기방법으로 4.5% SDS-electrophoresis를 한 결과 세 종류의 각막내피세포에서 마우스의 strain에 관계없이, SV-40 virus의 transfection에 관계없이 collagen type I이 주로 expression되는 것을 알수 있었다. 이는 마우스 각막내피세포를 일차 배양시 petri dish 또는 plate에 했으므로 Descemet's membrane-type matrix에서 배양했을때 collagen IV가 주 교원질인 경우와 다름을 의미한다 (figure 21).

## 2-6) In vitro에서 각막내피세포로의 B-galactosidase 주입

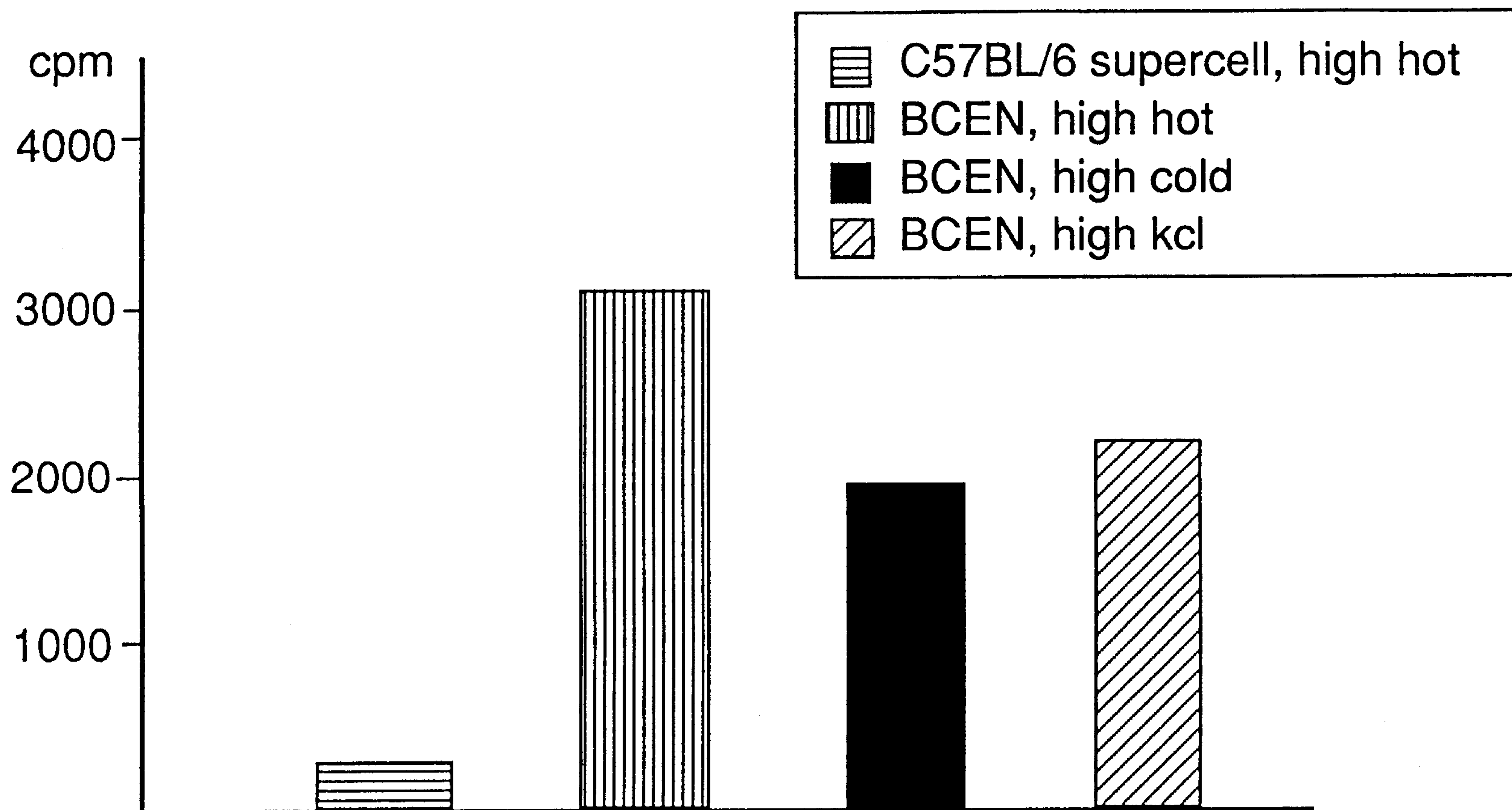
방법:

24-well plate에 well당 5X10<sup>4</sup>의 우안 각막내피세 plating하여 confluent하게 될 때까지 배양한다. 한편 polystyrene tube에서 DMEM과 Lipofectin을 혼합한다. 여기에 B-galactosidase를 넣고 실온에서 10-20분 동안 놓아둔다. 배양된 세포를 DMEM으로 세번 씻어주고 200ul의 DMEM을 well당가해준다. 그 다음 만들어 두었던 B-galactosidase 혼합액을 넣어주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 세시간 동안 배양한다. 세 시간 후에 complete media 를 well당 2ml씩 넣어주고 overnight시킨다. 다음 날, PBS로 cell을 wash하여 70%의 에탄올로 한 시간동안 4°C에서 고정시킨 뒤 다시 PBS로 씻어준다. B-galactosidase를 develope하기 위해 충분한 x-gal stain stock solution을 가해주고 37°C에서 blue stain이 나타날 때 까지 놓아둔다. 원하는 발색이 되면 PBS로 cell을 씻어준다.

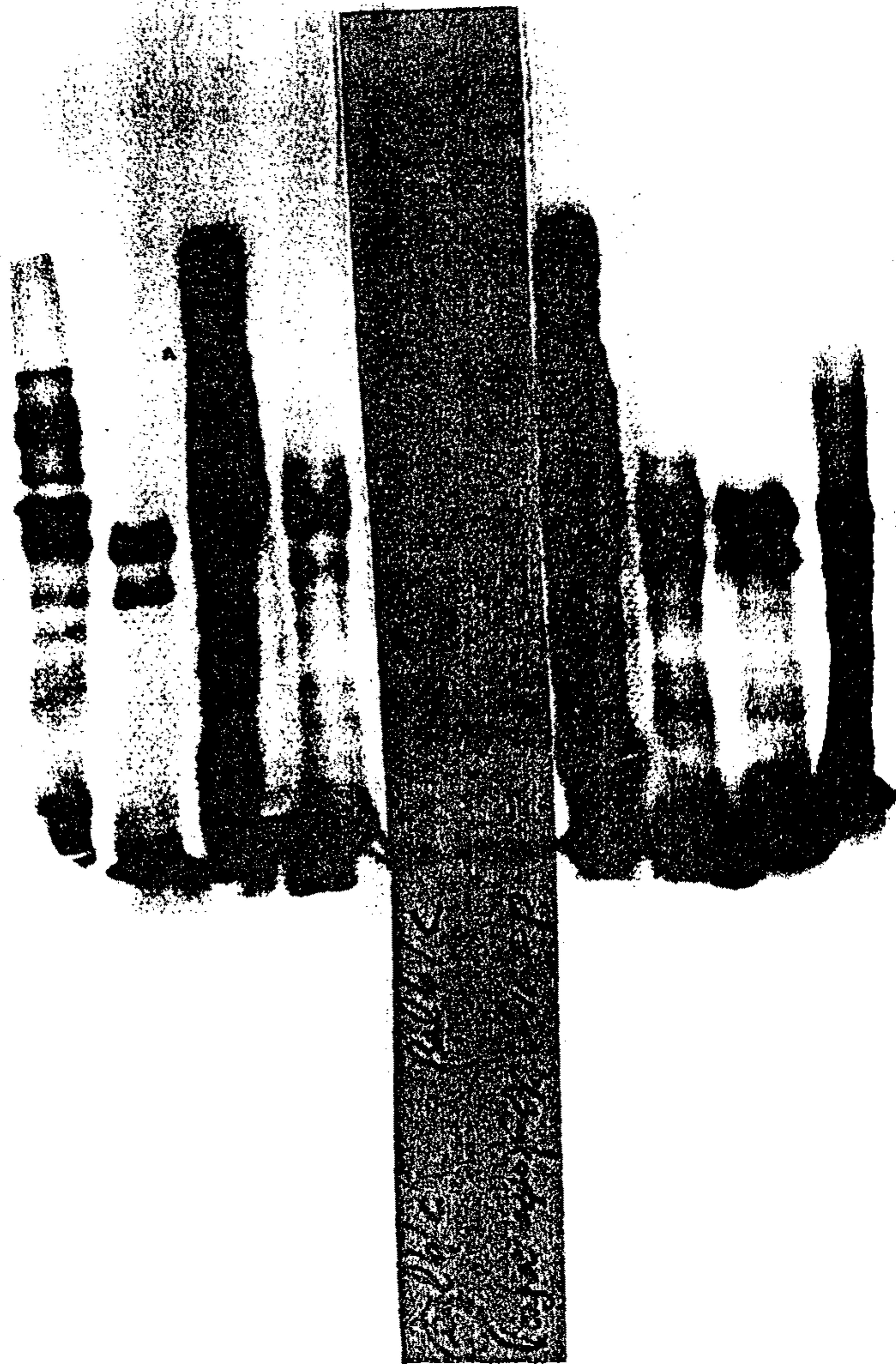
결과:

x-gal stain 처리 한 시간 후부터 발색되기 시작하였다. cell 수가 비교적 적고 cell 사이의 간격이 비교적 넓은 부분이 좀 더 빨리 발색을 나타내었다. 세포핵뿐만이 아니라 세포질에서도 발색이 나타났다 (figure 22). 이상의 결과에서 lipofectamin을 이용한 원하는 단백질의 주입은 매우효과적이었다.



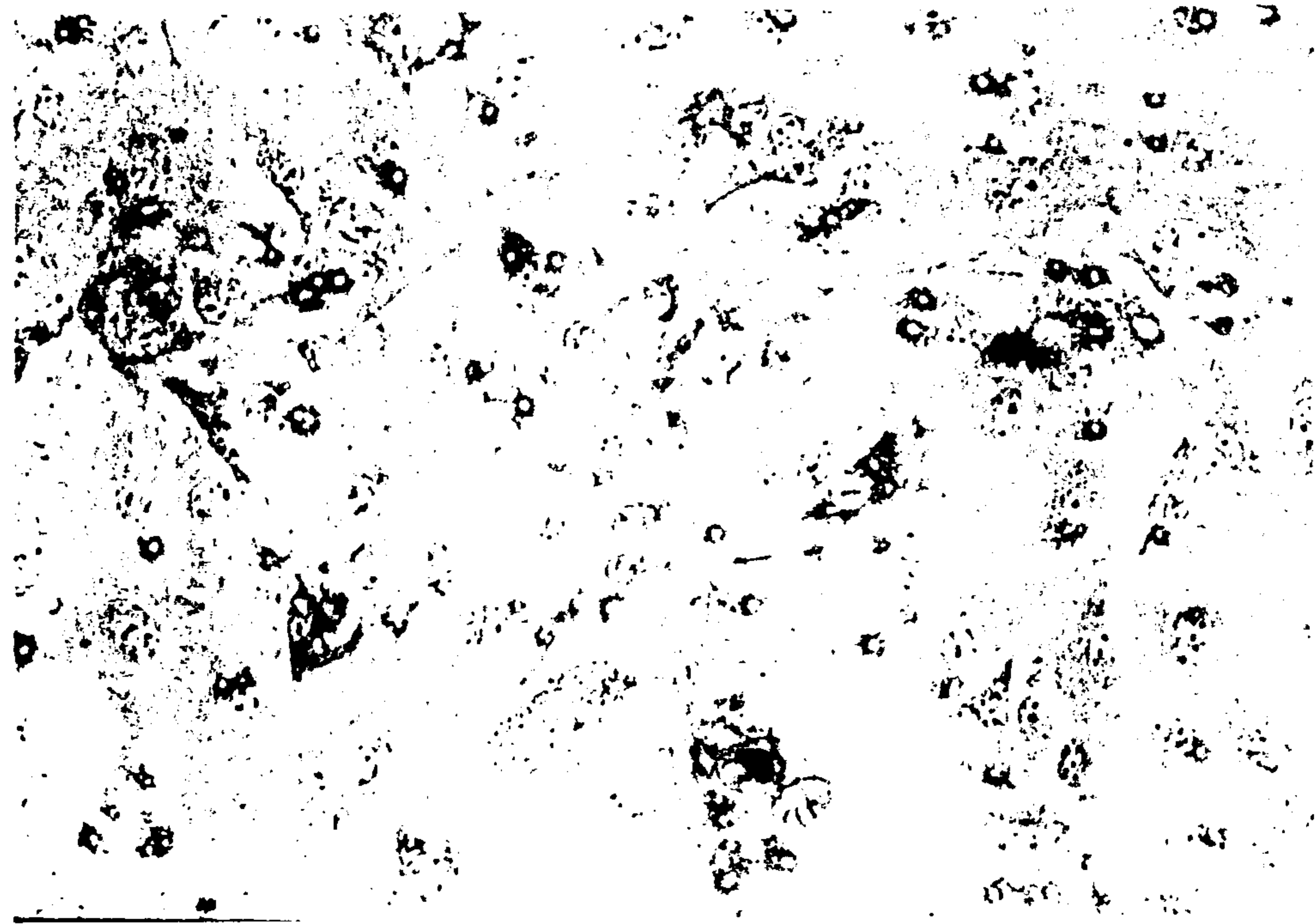


**Fig. 20** <sup>3</sup>H] ouabain binding assay. <sup>3</sup>H] ouabain binding of supercells was lower than that of bovine corneal endothelial cells (BCEN). In the condition of high cold ouabain the binding of <sup>3</sup>H] ouabain was decreased to 59%, while in the condition of high KCl, that was to 71%.



**Fig. 21** 4.5% SDS-electrophoresis of supercells (NIH, Balb/c, and C57BL/6) for type of collagen. Regardless of the condition ( before or after transfection) type 1 collagen is a major type (Data from EunDuck Kay, Ph.D.)





**Fig. 22** Transfection of B-galactosidase to bovine corneal endothelial cells (BCEN). BCEN was incubated with B-galactosidase plus lipofectin for 4 hours and washed with PBS. B-galactosidase inside the cell developed a green color after adding X-gal.

### 3차년도

#### 3-1) 사람각막내피세포로 supercell line 확보

방법:

사람 각막이식을 하고자 준비되었던 각막중 어떤 이유에서든 사용 못했던 sample을 모아서 각막내피세포 배양을 시도한다. Dissecting 현미경하에서 미세수술기기로 Descemet막과 각막내피세포층을 분리한 후 0.005% trypsin으로 처리하여 각막내피세포를 Descemet막으로 분리하여 culture해야 배양이 된다. 7-10일 후 confluence가 이루어지면 SV-40 virus hybrid로 감염시키고, 형태학적, 생화학적, 생리학적 기능을 확인한다. 방법으로는 Ad12-SV40 virus(National Cancer Institute의 Cellular and Molecular Biology에 있는 Dr.J.Rhim으로 공급받았음)로 vero 세포를 감염시킨다. 그리고 virus가 포함된 배양상층액을 모아 vero 세포의 cytopathic 효과를 관찰한다. virus의 titier는 vero 세포를 사용하여 plaque assay 방법으로 결정하고 primary 각막내피세포는 virus stock으로 multiplicity of infection(MOI)가 0.1이 되게 37°C에서 4시간 감염시킨다. 그후 세포들은 PBS로 씻어내고 10% FCS, bFGF(5ng/ml), EGF(10ng/ml) 그리고 insulin(5 $\mu$ g/ml)가 포함되어 있는 DMEM에 배양한다. 계대배양은 0.1% trypsin : EDTA 용액으로 처리한 후 split 배율을 1:10으로 한다. 이들 세포들이 SV-40 virus에 잘 infection되어 있는지 확인하기 위하여 SV40 large T antigen에 대한 항체 Ab-2 (cat #DPO2, Oncogene science)를 사용하여 확인하였다

결과:

사람의 각막내피세포는 증식에 한계가 있고 계대배양이 안되는데 SV40 hybrid로 infection된 경우에는 계대배양이 잘되었고 세포핵내에 SV40 T항원의 항체인 Ab-2로 98%이상 잘 염색되었다

#### 3-2) 각막내피세포의 성장인자와 성장인자 수용체의 확인

방법:

세포막의 receptor 확인은 세포들을 70% methanol로 15분간 실온에서 고정하고 말린 후 PH 7.6상태의 50mM Tris buffer로 rehydrate시킨다. 그 후 primary 항체인 EGF (# SC-1836, Santa Cruz Biotechnology), VEGF(# SC-1836, Santa Cruz Biotechnology), PDGF (# SC-128, Santa Cruz Biotechnology), TGF $\beta$ 1(# SC-146, Santa Cruz Biotechnology), TGF $\beta$ 2(# SC-090, Santa Cruz Biotechnology) 를 첨부하여 실온 2시간 방치한 후 Tris buffer로 5번 씻어낸다. 결합된 항체-avidin-biotin-peroxidase 복합체는 DAB(1mg/ml)을 추가하면 광학대로 관찰된다.

EGF, FGF, PDGF의 수용체에 대한 mRNA 발현은 Stratagene oligonucleotide를 이용하고자 한다. 계대배양된 supercell과 중앙 안은행에서 얻은 각막내피세포에서 RNA의 1 $\mu$ g을 Promega reverse transcription kit를 사용하여 역전사시키고 Stratagene oligonucleotide와 Perkin Elmer Cetus DNA 증폭 kit를 사용하여 4-5 $\mu$ l의 대사물을 증폭 시킨다. 25내지 30주기를 거친 후 2% agarose gel에 running 시키고 ethidium bromide로 염색하여 조사하고자 하는 성장인자 수용체가 표현되었는지 확인한다.

좀더 정확한 mRNA의 정량분석을 하기 위해 PCR방법을 사용하였다. EGF-receptor, FGF-receptor, PDGF-receptor와 TGF- $\beta$  genes에 대한 primer의 complementary sequence로 구성된 multi-insert plasmid를 사용할 것이다. 이 기본 과정은 다른 plasmid를 사용하여 IL-4 transgenic 마우스의 cytokines들을 분석한 Pfatzer에 의해 성공적으로 시행되었다.

방법으로는 1 $\mu$ g의 RNA를 전사하여 cDNA를 만든다. 그리고 primers의 각 성장인자의 수용체에 해당하는 band 농도를 정하기 위해 multi-insert plasmid에 대한 각 growth factor receptor에 대한 oligonucleotide primers의 titer를 정한다. plasmid가 없는 sample을 control로 하고 plasmid의 가장 높은 농도의 band 밀도를 정하기 위해 cDNA가 없는 sample을 사용한다. 반응을 30회 돌리고 생성물을 1.5% agarose에 분리 시킨다. 이들 여러 가지 반응으로 부터 band



의 밀도를 비교함으로써 cDNA sample에서의 물질수를 알 수 있다.

결과:

우안의 각막내피세포는 VEGF, EGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1과 TGF- $\beta$ 2에 대하여 강한 면역화학 반응을 보였다(Fig. 23). 또한 RT-PCR로 각막내피세포의 수용체에 대하여 조사한 결과 EGFR, FDFR에 대하여는 강한 band를 보였으나 TGF- $\beta$ 에 대하여는 band가 흐렸으며 PDGFR에 대하여는 거의 반응을 보이지 않았다(Fig. 24).

### 3-3) Ex vivo에서의 B-galactosidase의 주입

방법:

DMEM, lipofectin, B-galactosidase의 혼합액을 만든다. Cornea를 trephine하여 떼어내고 DMEM으로 씻어서 준비한다. petridish에 B-galactosidase 혼합액을 20-30ul 떨어뜨리고 그 위에 cornea를 조심스럽게 얹어둔다. 그 상태로 37°C에서 3-6시간 동안 incubation한다. Incubation액을 제거하기 위해 DMEM으로 가볍게 씻어주고 X-gal stock solution을 petridish 위에 떨어구어 그 위에 cornea를 얹는다. 원하는 발색이 나타날 때 까지 놓아둔다.

결과:

24시간까지 X-gal에 대하여 염색이 진하게 되었으나 각막내피세포에 대한 독성이 커서 그 이후에는 세포내의 염색인지 아니면 Descemet막의 염색인지 구별이 용이하지 않았다. (Fig. 25)

### 3-4) In Vivo에서 전방으로 B-galactosidase주입후 각막내피세포로의 주입확인

방법:

Hyaluronic acid와 lipofectin, B-galactosidase의 혼합액을 만들어서 실온에서 20-30분간 놓아 둔다. Rat의 눈에서 방수를 뽑아내고 30 gauge needle을 이용하여 만들어 두었던 B-galactosidase 혼합액을 injection한다. 24시간 후 injection된 안구를 뽑아서 cryo-section을 시행한다. section된 조직을 고정하여 X-gal을 실온에서 원하는 발색이 나타날 때 까지 염색한다.

결과:

동물실험에서는 B-gal의 각막내피세포내로의 침투가 매우 효율이 낮았으나 확실히 침투되어 X-gal염색이 잘되어 있는것도 관찰되었다(Fig. 26).

### 3-5) In vitro에서 각막내피세포에 SV-40 large T Ag protein을 주입후 면역조직 검사

방법:

cell을 plating하여 50-80%의 confluency를 이룰 때 까지 기다린다. polystyrene tube에 DMEM과 SV-40 T Ag을 섞은 것과 DMEM과 LIPOFECTAMIN을 섞은 것을 각각 만들어 두었다가 한데 섞고 45분간 SV-40 TAg-liposome complex를 만들 수 있도록 놓아둔다. 그 동안 cell을 씻고 complex가 담긴 tube에 serum free media를 섞어 cell에 가한다. 5-6시간 동안 37°C에서 incubation한 뒤 complete growth media를 가한다. 24-48시간 배양 후에 면역조직검사를 실시한다. 먼저 세포를 70% 에탄올로 1시간 동안 실온에서 고정한다. PBS로 두번 씻어내고 blocking serum을 가한다. 20-30분 후에 blocking serum을 제거하고 SV-40 TAg에 대한 primary antibody를 가해 30분-3시간 동안 incubation한다. PBS로 씻어내고 secondary antibody를 30분 동안 incubation한다. 다시 PBS로 씻어내고 ABC용액으로 30분간 incubation한다. PBS로 씻어내고 AEC용액으로 원하는 발색을 얻는다. PBS로 cell을 씻는다.

결과:

가장 최적의 조건은 lipofectin을 5ug- 7.5ug/ml으로 SV-40 T항원을 5ug/ml로 하였을때 각막내피세포의 농도가 적은 가장자리에서 가장 잘 transfection되었다(Fig. 27)



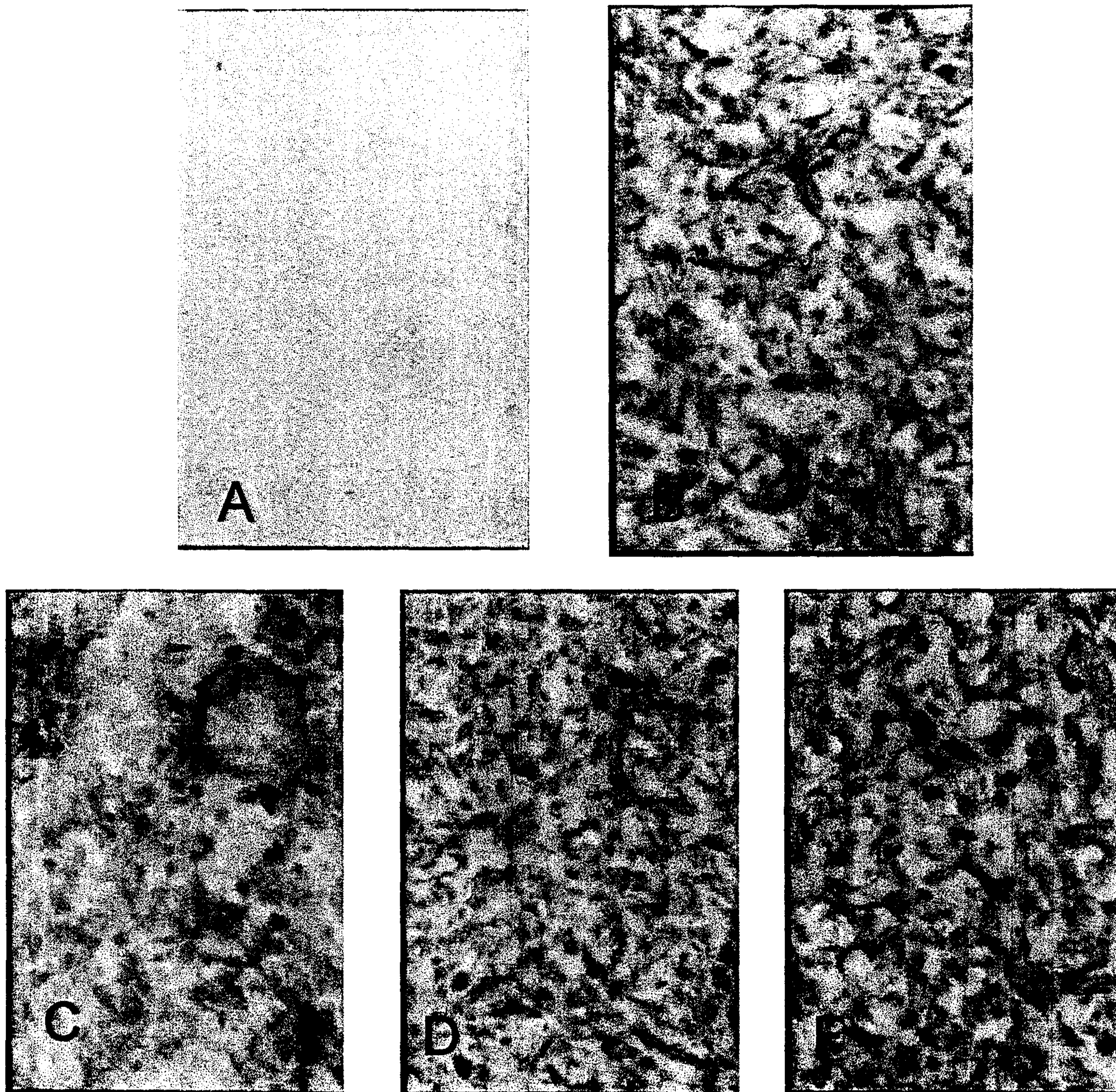
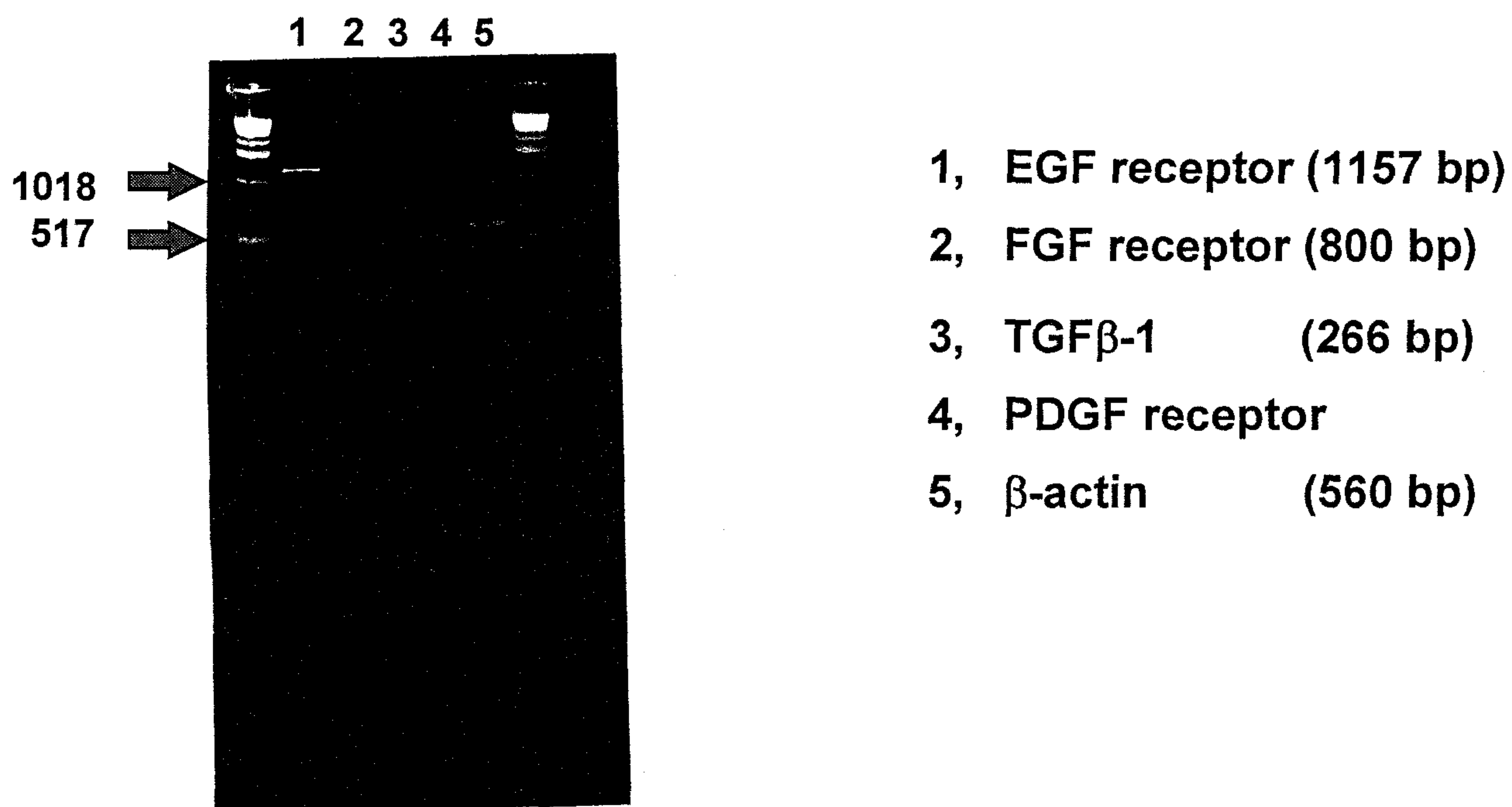


Fig. 23 Immunohistochemical stainings of bovine corneal endothelial cells with VEGF(A), EGF(B), PDGF(C), TGF- $\beta_1$ (D), and TGF- $\beta_2$ (F).





**Figure 24. The expression of growth factor and growth factor receptors in bovine corneal endothelial cells**

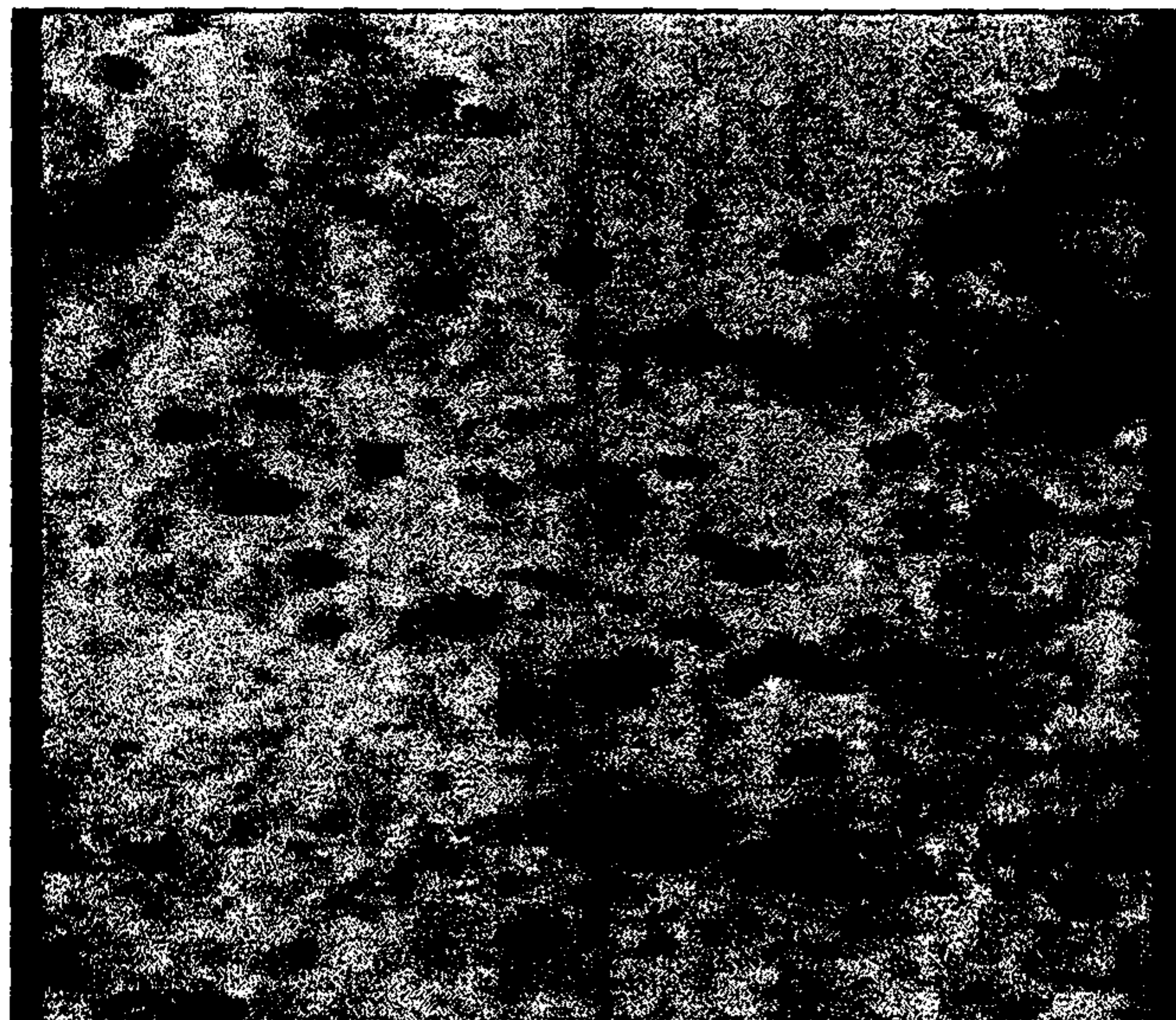


Fig. 25 X-gal staining of bovine corneal endothelial cells after treatment with  $\beta$ -galactosidase and lipofectamine *ex vivo*



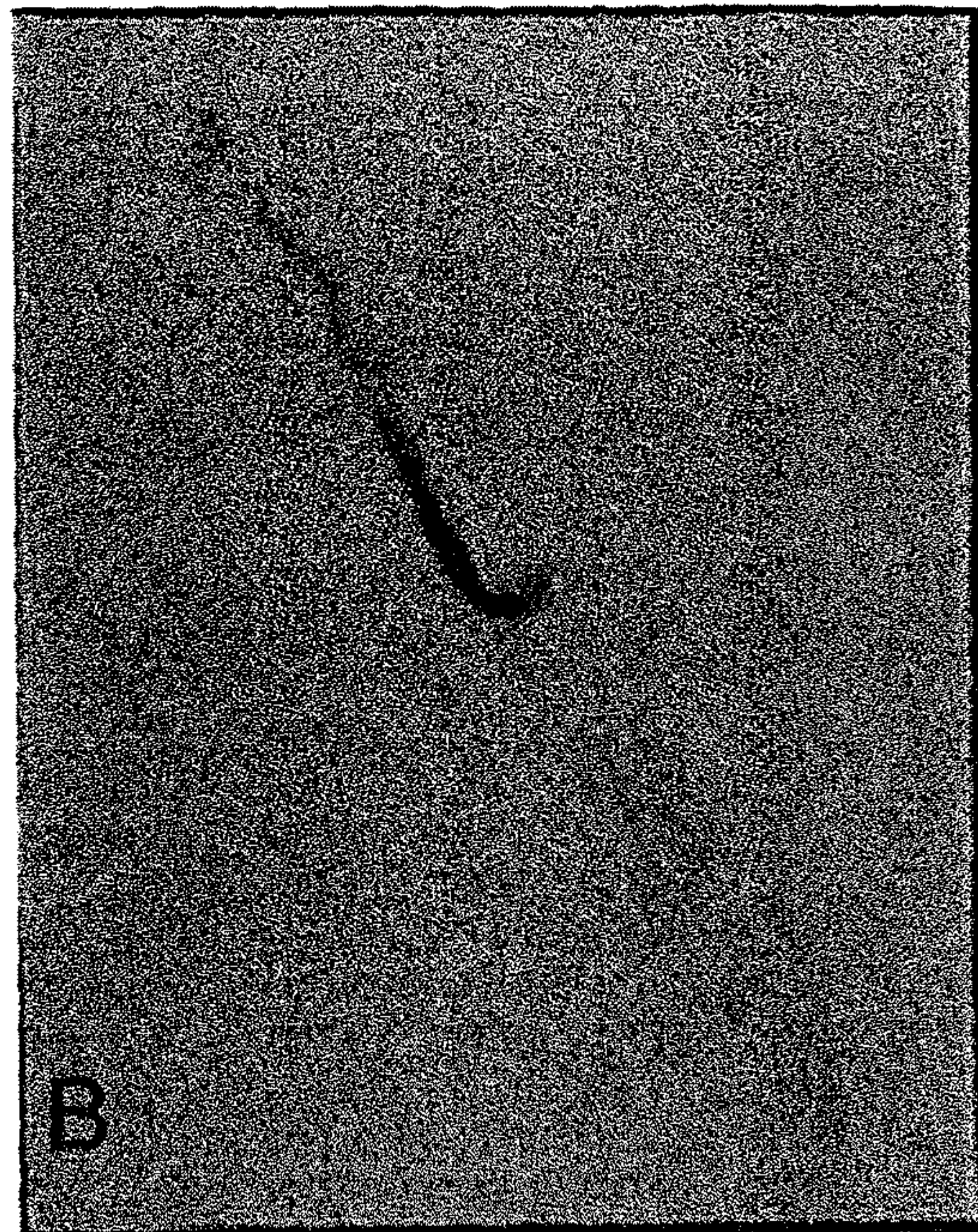
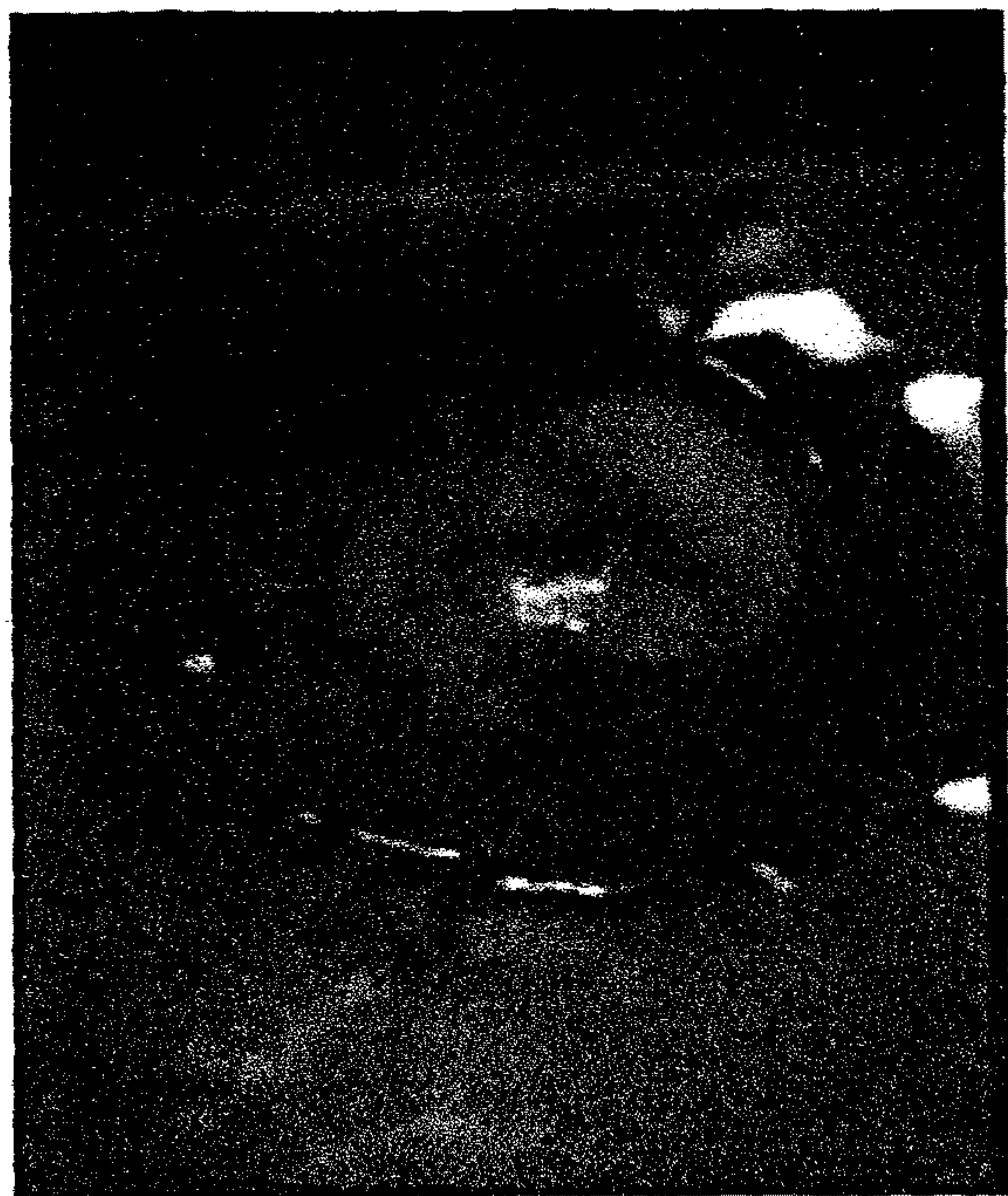
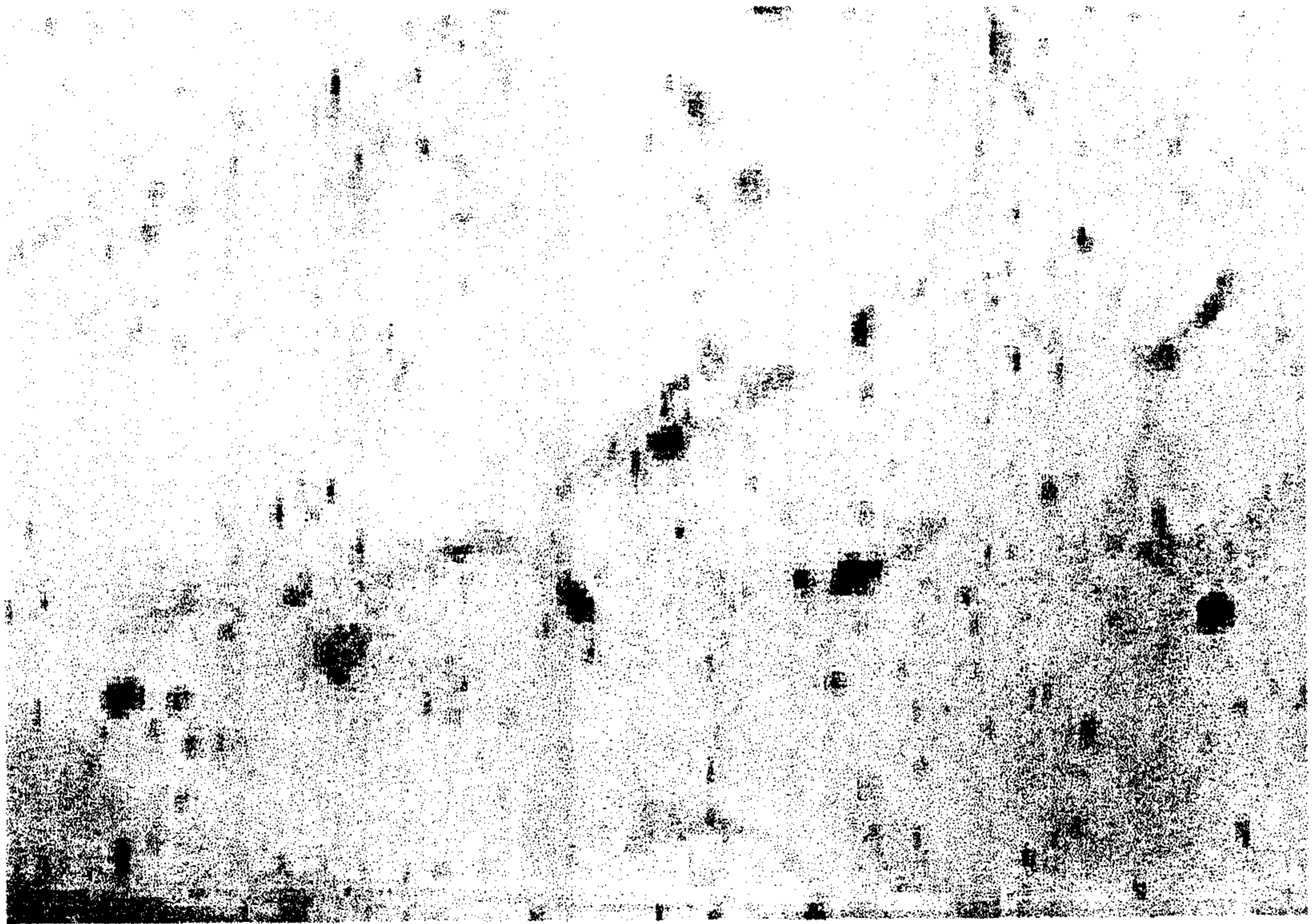


Fig. 26 X-gal staining of bovine corneal endothelial cells(BCEC) after injecting  $\beta$ -galactosidase and lipofectamine in vivo. (A) photographs of eyeball and (B)photomicroscopy of BCEC





**Fig. 27 Ab-2 staining of BCEC after treatment with SV-40 T Ag and lipofectamine**



### 3-6) In vitro에서 BrdU를 이용한 cell proliferation의 확인

방법:

Labelling media를 1:1000으로 dilution하여 사용 전에 37°C로 온도를 맞추어 둔다. Plating 된 cell에 있던 media를 제거하고 labelling media를 넣어서 1시간 동안 37°C에서 incubation 한다. Labelling media를 제거하고 PBS로 살짝씻는다. 70% ethanol로 30분 동안 cell을 고정한다. PBS로 다시 cell을 씻고 nuclease / anti-5-bromo-2'-deoxyuridine을 가해 1시간 동안 실온에서 incubation한다. PBS로 각각 3분씩 세 번을 씻어내고 peroxidase anti-mouse IgG2a를 넣고 30분 동안 incubation한다. 그 다음 cell을 PBS로 세번 씻고 DAB solution과 substrate/intensifier를 혼합한 다음 cell에 가해 5-10분 동안 발색시키고 D.W로 씻어 counter stain한다.

결과:

우안의 각막내피세포는 어느정도 증식능력이 있으므로 전체 세포의 40%-50%에서 BrdU에 염색이 되었다 (Fig. 28)

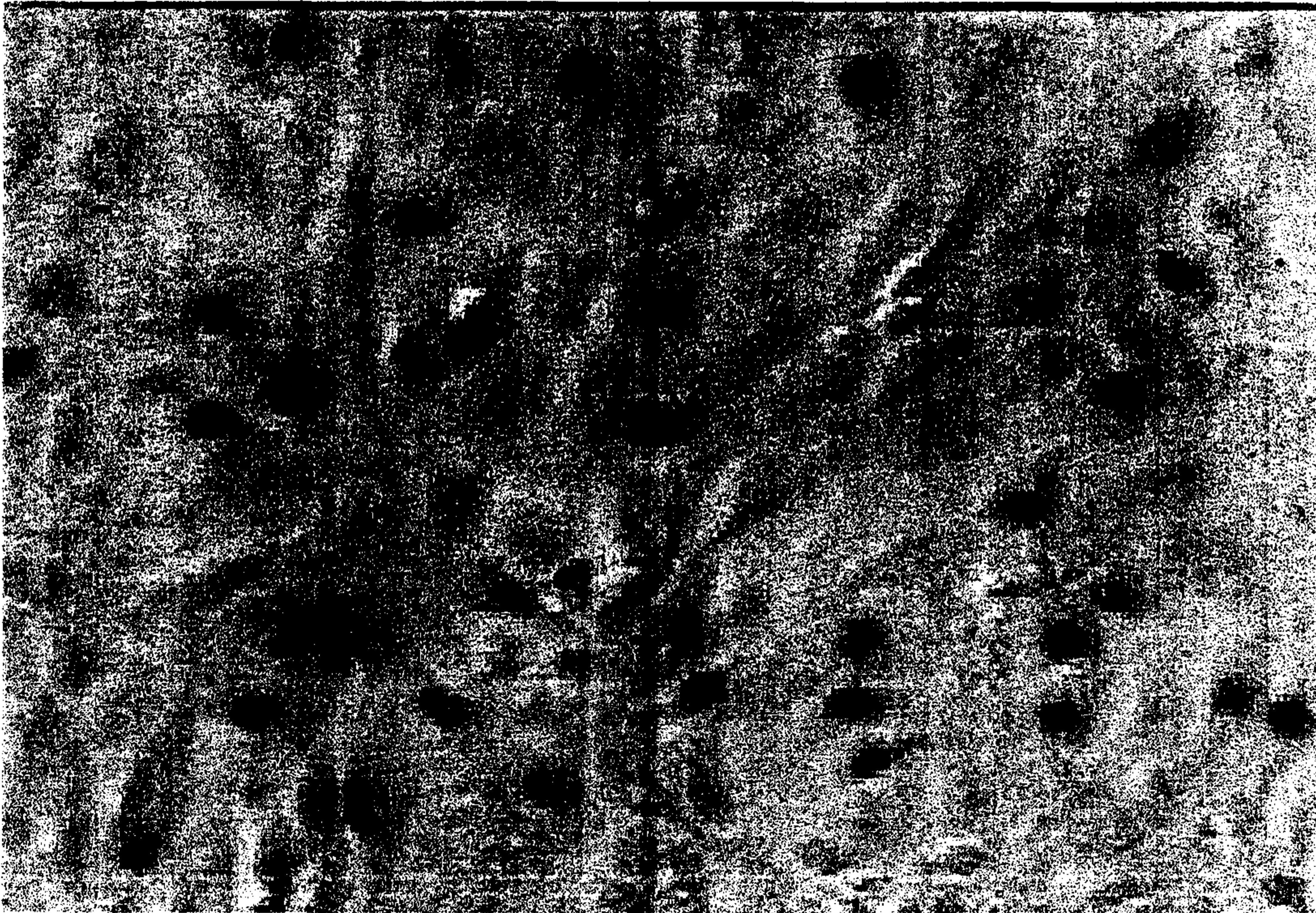


Fig. 28 Proliferation assay of BCEC with BrdU kit.



## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

가. 연구개발 목표의 달성도  
1차 년도

목 표	진도(%)	평가의 착안점
Sv-40 hybrid로 형질 변형시킨 마우스(C57BL/6, BALB/C and NIH) 각막내피세포 (super cell)의 cell line 구축	100	본 연구실에서 large T Ag에 대한 항체로 염색하여 확인
Super cell의 세포막 성장 수용체 확인	100	Super cell의 성장인자 수용체가 primary cell과 동일하다는 것을 면역세포화학검사로 입증
Super cell의 재생능력 확인	100	<sup>3</sup> [H] thymidine 검사로 제3세대 계대배양 후에도 uptake가 높음을 입증
Super cell의 각막의 Descemet 막 위에서 기능확인	100	위상차 현미경과 전자현미경으로 세포배양기 안에서 2시간이내에 cell adhesion과정을 확인
Super cell의 생리적 기능확인	100	Ouavain test로 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> pumping 작용이 down regulate 되어있는 것을 확인



2차년도

연구개발목표	진도(%)	평가의 착안점
Donor 각막의 Supercell로 각막내피 세포를 대치후 각막이식	100	성공적인 각막이식으로 임상score와 supercell이 Descemet막위에 존재하는 것 확인
Cytotoxic Tlymphocylc (CTL) assay 와 Delayed type hypersensitivity (DTH)반응검사	100	각막이식의 대표적인 면역반응인 CTL과 DTH를 조사함으로써 T림프구에 의한 반응을 증명함
Supercell의 전방내에서 안전성 검사	95	전방내로 항원성 세포를 주입함으로써 세포이식의 안전성을 확인함
임파구의 전방 주입후 ACAID 유도	100	전방내에 주입되는 supercell이 면역반응을 일으키지 않고 억제반응을 일으키는 적정농도를 확인함
Supercell의 Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> Pumping 작용의 재확인	100	Supercell의 각막의 투명성을 유지하기 위한 생리적 기능이 저하되어 있음을 증명함
Super cell phenotype확인	100	생성하는 교원질의 종류를 gel상에서 증명함으로써 섬유화세포로 전이가 되어 있음을 간접적으로 증명함

3차년도

연구개발목표	진도(%)	사유
1. 각막내피세포의 성장인자 확인	100%	각막내피세포에서 EGF, PDGF, FGF등의 생산을 면역화학검사법으로 증명함
2. 각막내피세포의 성장인자 확인	100%	면역세포화학검사로 각막내피세포의 EGF, PDGF, VEGF, TGF-β1, TGF-β2등을 증명함
3. In vitro에서 liposome과 B-gal을 이용한 주입	100%	각막내피세포로 lipofectin을 이용한 단백질 주입의 가능성을 증명함
4. In vivo에서 liposome과 B-gal을 이용한 주입법	100%	동물모델에서 lipofectin을 이용한 단백질 주입을 확인하고 효율에 대한 문제점을 제시함
5. Ex vivo에서 liposome과 B-gal을 이용한 주입법	100%	각막내피세포로 단백질 주입의 정확도를 높이기 위하여 고효율의 X-gal염색법을 개발
6. 사람 각막내피세포로 SV-40 바이러스를 감염시켜 cell line 구축	100%	실제 사람의 각막내피세포에 extended life span을 갖는 조건을 만들고 앞으로의 연구조건 확립
7. 각막내피세포에 SV-40 T항원 단백을 주입시킴	90%	각막내피세포의 phenotype을 변형시키지 않고 증식효과만을 가능하게함.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- \* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목적은 변경 가능함.

이연구는 3년 계획하여 각막전층이식에서 각막내피세포이식으로 전환을 목표로 하였으며 일차적으로 sv-40 virus hybrid를 이용하여 재생능력의 한계가 있는 세포를 계대배양이 가능하도록 형질변환을 이룩하였다. 이차단계로는 우리가 원하는 유전단백을 주입하는 system을 구축하여 phenotype의 변화없이 증식을 할수 있는 방법을 개발하였다. 이에대한 의미는

1. virus를 이용하여 세포의 성질변화 확인
2. 세포성질변화에 따른 세포의 성장인자 수용체검증
3. 성질변화된 세포의 실제 세포이식
4. 성질변화된 세포의 형질변경에 대한 다각적 연구
5. 성질변화된 세포의 세포이식시 안전성
6. 세포이식에서 형태학적 성공성 검증
7. 유전단백의 세포내 주입법 개발
8. 유전단백의 세포내 주입법의 시험관내에서와 동물실험에서 확인
9. 사람 각막내피세포로 재생능력을 갖춘 cell line의 구축

상기의 연구내용의 결과로

1. 인체 여러장기의 cell transformation의 가능성을 제시하고
2. 바이러스를 이용한 세포 성질변화의 문제점을 제시하여 세포이식을 한단계 더발전시켰으며
3. 세포이식의 성공을 평가할수 있는 기준을 확립하였고
4. 세포의 형질변경없는 유전단백의 주입법 개발을 하였다.

이는 성공적인 각막내피세포기능 또는 수부족으로 인한 각막부종 및 각막혼탁을 해결하는 방법을 제시하고 다른 장기의 세포이식방법 개발에 지대한 공헌을 하는 것이다.

## 제 6 장 참고문헌

\* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

1. Alvarado JA, Gospdarowicz D, Greenburg G. Corneal endothelial replacement. Invest Ophthalmol. 1981;21:300
2. Insler MS, LOpez JG. Transplantation of cultured huma neonatal corneal endothlium. Curr Eye Res 1986 ; 5:967
3. Raphael B, Lange T, Wood TO, McLaughlin BJ. Growth of human corneal endothelium on altered descemet's membrane. Cornea 1992;11:242
4. She S-C, Steahly LP, and Moticka EJ. A method for performing full-thickness, orthotopic, penetrating keratoplasty in the mouse. Ophthalmic Surg. 1990 ; 21:781
5. Rhim JS, Jay G, Arnstein P, Price F, Sanford K, and Aaronson S. Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. Science 1985 ; 227:1250
6. Zeitlin PL, LuL, Rhim J, et al. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line : immortalization by adeno-12-SV40 infection. Am. J. Respir. Cell Mol. Bil. 1991 ; 4:313
7. Kahn CR Young E, Lee IH, Rhim JS. Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span : in vitro model for ocular studied. Invest Ophthal Vis Sci 1993 ; 34:3429
8. Araki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. Immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV40-adenovirus vector. Invest Ophthal Vis Sci 1993 ; 34:2665
9. Feldman S, Gjerset R, Gately D, Chien KR, and Feramisc JR. Expression of SV40 large T antigen by recombinant adenoviruses activates proliferation of corneal endothelium in vitro. J Clin Invest. 1993 ; 91:1713
10. Sugar, A. 1989. A analysis of corneal endothelial and graft survival in pseudophakic bullous keratopathy. Tran. Am. Ophthalmol. Soc. 87:762
11. Council on Scientific Affairs. Report of the Organ Transplant Panel : Corneal Transplantation. JAMA 1988. 259 : 719
12. Niderdorn, J. Y. 1990. Immune privilege and immune regulation in the eye. Adv. Immunol. 48:191
13. Granstein, R.D.,R. Staszewski, T.L. Knisely, El. Zeira, R. Nazareno, M. Latina, and D.M. Albert. 1990. Aqueous humor contains transforming growth factor- $\beta$  and a small (<3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. J. Immunol. 144 :302-3027
14. Cousins, S.W., M.M. McCABE, Danielpour, and J. W. Streilein. 1991. Identification of transforming growth factor  $\beta$  as an immimpsi[[ressove factor in aqueous humor. Invest. Ophthal. Vis. Sci. 32:2201
15. Streilein, J.W., G.A. Wilbanks, A. Taylor, and S. Cousins. 1992. Eye-derived cytokines and the immunosuppressive intraocular microenvironment : a review. Curr. Eye Res. 11 :41
16. Wilbanks, G.A., and J.W. Streilein. 1990. Characterization of suppressor cell(s) in anterior chamber-associated immune deviation(ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. Immunolgy 71:383
17. Streilein, J.W., and J.Y. Niderkorn. 1985. Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated imune deviation(ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppreddor cell populartions. Immunology 71 : 383
18. Sonoda Y., B. Ksander, and J. W. Streilein. 1992. Impaired cell mediated immunity



- (ACAID) induced in mice that accept orthotopic corneal allografts indefinitely. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 33 : 843
19. Sonoda, Y., and J. W. Streilein. 1993. Impaired cell-mediated immunity in mice bearing healthy orthotopic corneal allografts. J. Immunol. 150-1727
  20. Sonoda, Y., and J.W. Streilein. 1992. Orthotopic corneal transplantation in mice evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply. Transplant. 54 : 694
  21. Laiho M, De Caprio JA, Ludlow JW, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J. Growth inhibition by TGF- $\beta$  linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. Cell. 1990; 62 :175-185.
  22. Sorrentino V, Bandyopadhyay S. TGF- $\beta$  inhibits G0/S-phase transition in primary fibroblasts : Loss of response to the antigrowth effect of TGF- $\beta$  is observed after immortalization. Oncogene. 1989 ; 4:569-574.
  23. Wilson SE, Lloyd SA, He Y-G, McCash C. Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993;34:2112-2123.
  24. He, Y., J. Ross, and J. and J. Y. Niederkorn. 1991. Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:2723.
  25. Katami, M., P.W. Madden, D.J.G. White, P.G Watson, and N. Kamada. 1989. The extent of immunological privilege of orthotopic corneal grafts in the in bred eye. Transplantation. 48:371.