GOVP1200211634

2000-N-NL-01-C-121

백내장 기전연구를 통한 후발성 백내장의 억제기술

Technology for prevention of after-cataract via cataractogenesis study

가톨릭대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 "백내장 기전연구를 통한 후발성 백내장의 억제기술에 관한 연구"과제의 보고서로 제출합니다.

2002 . 1 .

주관연구기관명 : 가톨릭대학교

주관연구책임자 : 주 천 기

연 구 원(내부): 김 재 호, 유 지 창
" : 김 만 수, 천 명 훈
" : 김 기 봉, 한 태 원
" : 문 정 일, 김 성 주
" : 유 지 창, 전 홍 재
" : 곽 노 훈, 황 은 주
" : 유 진 성, 이 광 원
" : 정 성 근, 김 정 아
" (외부): 박 명 옥, 최 준 섭
" : 조 익 훈, 황 경 훈
" : 최 준 섭, 홍 성 백
" : 김 종 탁, 박 상 규
" : 남 혁 준, 한 상 조
" : 김 해 숙, 조 경 선
" : 최 종 규, 박 지 영
" : 김 세 진, 박 현 경
" : 임 정 민, 서 문 영
" : 박 지 영, 홍 승 표
" : 김 장 현, 박 선 영
" : 김 현 진, 송 보 미
" : 김 동 환, 최 성 미
" : 류 정 묵, 송 인 경
" : 전 홍 균, 이 석 종
" : 한 지 영, 김 문 경
" : 박 선 미

요 약 문

Ⅰ. 제 목

백내장 기전연구를 통한 후발성 백내장의 억제기술

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

후발성백내장은 단일 질병으로서 의료비 지출이 가장 많은 백내장의 수술후유증으로 이에 대한 국가적인 사회적, 경제적 피해는 심각하다. 본 연구의 목적은 수정체상피세포의 증식, 분화, 변형, 이동,사멸 등의 기초적인 연구를 토대로 선택적인 유전자치료와 인공수정체나 수정체확장 고리를 이용한 물리적, 약학적 치료법을 개발하는 것이다.

이 연구에서 핵심을 이루고 있는 세포의 증식,이동과 변형에 대한 연구는 암억제기술, 신경세포사 방지 기술과 함께 의과학 분야에서 해결되어야 할 21세기의 핵심이 되는 의과학 기술의 하나로 이에 대한 기전연구는 차후 간경화, 섬유화성 폐질환 및 신장질환, 피부와 뼈의 창상치유, 당뇨병성 초자체증식증 등 다른 주요한 질병의 원인을 근본적으로 이해하는 데에도 큰 공헌을 할 수 있을 것이다. 이 연구에서 다루어질 세포의 변형이 문제가 되는 많은 질병을 가정하면 이 연구 종료시점에서 파생되어지는 효과는 국가 경제적으로 매우 큰 의의가 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 1단계의 목표로는 크게 5가지로 나눌수 있다,

1. 수정체상피세포의 증식, 이동, 변형에 대한 기전과 억제책의 탐구
2. 수정체상피세포 특이적 suicide gene 검색 및 확보
3. 수정체상피세포표적 lentiviral vector system 개발
4. 백내장 발생에 관련된 유전자조사
5. 수정체낭내에서 약물전달시스템의 방법개발

각각의 세부목표의 내용 및 범위를 간단히 살펴보면,

가. 변형된 세포에서 세포외 기질, 세포 표면 물질, 세포외 기질 분해효소, heat shock protein, growth factor의 발현 분석

나. Growth factor 및 세포외기질이 수정체상피세포의 변형에 미치는 영향조사

다. 변형된 세포에 특이하게 발현되는 새로운 유전자의 탐색

라. 세포변형을 유도할 수 있는 candidate gene의 screening

마. 수정체상피세포만을 선별적으로 사멸시키기 위한 suicide gene의 검색과 그의 발현 방법개발확립

바. 유전성백내장환자와 전낭하 백내장 환자의 DNA확보

사. 안내장구를 이용한 물리적 및 화학적 후발성 백내장 억제기술

Ⅳ. 연구개발결과

1. 변형된 세포에서 세포외 기질, 세포 표면 물질, 세포외 기질 분해효소, heat shock protein, growth factor의 발현 분석

가. H_2O_2 에 의한 CTGF 발현

나. TGF-β에 의한 세포변이 및 이동현상에서의 integrin alpha 6 의 변화

다. MMP-2 overexpression을 통한 수정체 상피세포의 변형과정 연구

라. 변형된 수정체상피세포에서의 a-crystalline 발현양상비교

마. 수정체상피세포의 변형과정에 amyloid β-(1-40)-BSA conjugate의 역할

바. Glycation된 세포외기질이 수정체상피세포의 변형에 미치는 영향조사

2. EMT에 관련된 생물학적기전연구

가. 변형된세포에 발현되는 새로운 유전자의 탐색

나. 수정체상피세포만을 선별적으로 사멸시키기위한 suicide gene의 검색.

3. 안내장구를 이용한 물리적, 화학적 후발성백내장 억제기술

가. In vitro capsular bag model의 확립.

나. 수정체상피세포들만을 선택적으로 유전자 치료법을 개발하기 위한 recombinant virus를 제작.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

2단계 연구에서는 1단계 기초연구에 토대를 두어 drug delivery system 구축과 유전자치료를 위한 gene targeting을 위한 핵심기술의 확립에 있다.

이미 개발 및 확립된 수정체확장고리 및 In vitro capsular model을 사용하여 생체내에 자연적으로 흡수되게하는 Biodegrdable한 polymer를 사용하는 약물전달시스템의 개발은 나아가 제약회사연구소에 기술합작으로 약제를 이용한 억제방법으로 또한 유전자기술의 기반확립은 진단 kit과 억제기술억제방법으로 발전시킬 것이다.

특히 기초와 임상의 지적교류의 부족으로 문제점 접근이 어려운 실정은 세계적으로 보았을 때 본 연구실에서 추구하고 있는 기초연구와 임상연구가 동시에 가능한 효율적인 연구실에서 집중적으로 연구가 수행될 경우 한 걸음 빨리 국제적 경쟁력을 갖춘 결실을 맺을 것이다. 2년 간 본 연구실과 긴밀한 관계를 가진 (주)루시드코리아와 약물전달시스템의 (주)biopolymed와의 연구교루는 2단계의 연구수행에 있어 병행되어야 할 것이다. 결국 제약회사에 DDS의 기술을 전략적제휴 및 전수함과 생명공학연구소와 제약연구소에 targeting vector를 이용하여 후발성백내장을 억제방법을 확고히 구축하고자함에 있다.

S U M M A R Y

A substantial proportion of people who undergo cataract surgery develop secondary cataracts (after-cataract), a complication that increases the cost of cataract treatment because a second surgical procedure is required. Research has shown that secondary cataract formation is the result of an abnormal response of the residual lens epithelial cells that often remain after surgery and the epithelial-mesenchymal tranformation of the residual lens epithelia cells. If this process interferes with vision, laser treatment is required. Defining individual components involved in growth and the mechanistic detailes of the transdifferentiation process are therefore first step in identifying factors to target in developing preventive strategies for posterior subcapsular cataract. Therefore, it is essential to understand the regulation of proliferation, migration, differentation, and transdifferentiation of these cells in order to devise new cost-effective preventive strategies. Based on previous research, the progress has been made in idenfiying the intracellular and extracellular factors that regulate lens epithelial growth, transdifferentiation, and proliferation. However, very little is known about the numerous physical, genetic, and pharmacological approaches that target the residual lens epithelial cells after the surgery. Considering the PCO continues to draw attention of ARVO researchers, our previous molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transformation in the lens epithelial cells will definitely open the possibility of pharmacological and genetic intervention in situations involving abnormal proliferation and differentiation of the lens epithelial cells. We will further investigate a lentiviral vector-mediated transfer for transducing suicidal gene into proliferating and transdifferentiated lens epithelial cells and controlled release of the drug with biodegrdable polymers for subsequent removal of residual lens epithelial cells.

C O N T E N T S

Chpater I. Introduction

1. Purpose
2. Background
3. Research scope

Chapter II. Current status

1. Current research status in worldwide
2. Research impact on worldwide

Chpater III. Research methods and results

1. Methods
2. Content
3. Results

Chpater IV. Research Performance and Contribution

1. Accomplishment
2. Contribution
3. Research plan

Chapter V. Future plan

1. Background
2. Application plan

목 차

제 1 장 서론
1. 연구개발의 목적
2. 연구개발의 필요성
3. 연구개발의 범위
제 2 장 국내외 기술개발 현황
1. 국내외 기술개발 현황
2. 연구결과가 국내외 기술개발현황에 미치는 영향
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
1. 연구방법
2. 연구내용
3. 연구결과
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도
1. 연구개발목표 달성도
2. 관련분야의 기술발전에의 기여도
3. 연구결과(개발기술)의 활용계획 및 활용가능성
제 5 장 연구개발결과의 활용계획
1. 2단계 연구의 필요성
2. 타연구에의 응용가능성 및 기업화 추진방안
제 6 장 참고문헌

본 문

제 1 장 서론

1. 연구개발의 목적

후발성백내장은 단일 질병으로서 의료비 지출이 가장 많은 백내장의 수술후유증으로 (약 20 - 50%), 이에 대한 국가적인 사회적, 경제적 피해는 심각하다[1,2]. 본 연구의 목적은 수정체상피세포의 증식, 분화, 변형, 이동, 사멸 등의 기초적인 연구를 토대로 선택적인 유전자치료와 인공수정체나 수정체확장고리를 이용한 물리적, 약학적 치료법을 개발하는 것이다[3-5]. 관찰과 확인이 용이한 눈의 수정체라는 단일기관에서 분자생화학적 기초 연구를 발전시켜 세포와 단백질의 변성을 이해하려는 생명공학기술과 인공수정체와 수정체확장고리 등의 약물전달체계를 이용한 의공학 분야를 효율적으로 접목에 바탕으로 두어 본 연구실에서 기초연구에서부터 실제의 임상적용까지 연구의 효율과 실용화 가능성을 최대한 높혀 실제 인체에 적용 가능한 기술을 확립함에 있다[6-8].

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

(1)기술적 측면

세포의 변형을 연구하는 것은, 조절되지 않는 세포증식을 대상으로 하는 암연구와 필요한 세포의 퇴화를 연구하는 신경과학 연구와 더불어 많은 사회적, 의료 기술적, 경제적인 손실을 예방하는 차원에서 꼭 필요하다. 본 연구에서 대상으로 하고 있는 수정체는 출생 때부터 독립된 기관으로서 주위의 여러 세포와 교류가 단절되어 있어 세포의 변형과정을 가장 정확히 이해할 수 있고 장기관찰과 과학적인 분석이 용이하여 이를 소재로 연구하는 것은 세포내의 숨겨진 비밀현상을 밝힌다는 것은 단일 질병으로 노인인구에서 가장 많은 빈도로 나타나는 백내장과 후유증인 후발성백내장을 해결한다는 것과 여러 장기에서 나타나는 세포형질 변화의 기전을 밝히고 억제책에 대한 기본 정보를 제공한다는 의미에서 21세기를 준비하는 의료과학에 이바지하는 것이다. 특히 후발성 백내장의 억제기술은 수정체라는 주위조직과의 근접성, 연관성이 적은 독립기관을 대상으로 시력장애의 가장 주된 원인인 백내장의 원인을 규명하고 치료하는 것으로 이 기술은 수정체의 단백질을 제거한 후에 수정체낭의 가장자리에 남은 수정체상피세포의 증식, 이동과 변형을 조사하는 연구를 바탕으로 하며 다른 변수가 가장 많이 제거된 상태에서 세포의 노화, 분화, 변형을 억제하는 기술이다[9-11]. 이 연구에서 핵심을 이루고 있는 세포의 증식, 이동과 변형에 대한 연구는 암억제기술, 신경세포사 방지기술과 함께 의과학 분야에서 해결되어야 할 21세기의 핵심이 되는 의과학 기술의 하나로 이에 대한 기전 연구는 차후 간경화, 섬유화성 폐질환 및 신장질환, 피부와 뼈의 창상치유, 당뇨병성 초자체증식증등 다른 주요한 질병의 원인을 근본적으로 이해하는 데에도 큰 공헌을 할 수 있을 것이다[12-15].

(2)경제.산업적 측면

이 연구는 백내장수술 후 약 5년내에 30-55%에서 후발성백내장이 발생하고 이에 대한 치료가 합병증을 동반할 가능성이 많은 레이저 수술이라는 점과 한 질병에 대해 합병증을 억제하는 기술의 개발 부족으로 의료비 지출이 년간 약 800억원에서 1,200억원에 이르며, 후발성백내장의 빈도를 최소 30%라고 가정할 때

약 130억원이상이 소모되고 있다[1]. 이 연구에서 다루어질 세포의 변형이 문제가 되는 많은 질병을 가정하면 이 연구 종료시점에서 파생되어 지는 효과는 국가 경제적으로 매우 큰 의의가 있다.

(3)사회.문화적 측면

세계적으로 사회적, 직업적으로 타인의 도움이 필요한 시각장애의 인구가 현재 약 1억 6천만 명에 이르고, 이 숫자는 결정적인 의과학 기술의 개선이 이루어지지 않는 한 25년 후에는 두 배로 증가할 예정이다.이와 같이 백내장과 후발성백내장은 국가경제와 문화의 발달로 노령인구가 증가하고 있는 시점에서 점점 심각한 사회문제가 되고 있다.

3. 연구개발의 범위

본 연구의 1단계의 목표로는

(가) 수정체상피세포의 증식, 이동, 변형에 대한 기전과 억제책의 탐구

(나) 수정체상피세포 특이적 suicide gene 검색 및 확보

(다) 수정체상피세포표적 lentiviral vector system 개발

(라) 백내장 발생에 관련된 유전자조사

(마) 수정체낭내에서 약물전달시스템의 방법개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 현황

지난 1단계수행의 2년동안 국내의 기술동향과 수준을 보면 최근 Association of Research in Vision and Ophthalmology(ARVO)나 ASCRS(American Surgery of Cataract and Refractive Surgery)에서 학회의 참여를 통해서 알수있었듯이, 국내외적으로 후발성백내장에 관하여 기초적인 분자생물학적인 연구(cellular and molecular mechanism)와 여러 가지 동물모델(in vivo and in vitro capsular bag model)을 이용하여 수정체상피세포의 증식 및 이동에 관한 또한 물리적, 약물적인 치료법에 대한 연구가 활발이 이루어졌다[16-18]. 특히 2000년을 기점으로하여 사람의 안구 및 동물모델을 이용하여 후발성백내장에 볼수 있는 비정상적인 세포의 EMT 변형과 증식, 그리고 이동에 의한 결과라는 보고가 계속발표되고 있으며 이를 억제하는 연구가 계속 시도되고 있다[19-21].

2. 연구결과가 국내외 기술개발현황에 미치는 영향

본 실험실에서 지난 2년동안 연구 발표된 세포변형의 기전에 의한 후발성백내장의 기초연구는 차후 유전자치료 및 약물전달체계의 구축에 있어서 획기적인 자료가 되었으며 또한 최근 후발성백내장연구방향에 비추어볼 때 경쟁력있는 연구를 현재 수행하고 있다. 1단계연구결과로서 수정체상피세포의 증식, 이동, 변형에 대한 기전연구를 바탕으로 전낭하백내장발생에 관련된 유전자조사 및 수정체상피세포의 특이적 발현 suicide gene 검색 및 확보를 하였다[22,23]. 특히 수정체상피세포만을 특이적으로 목표로 하는 방법의 개선이 시도되고 있다[24]. 특히 원하는 유전자를 선택적으로 수정체상피세포에 주입 혹은 주변부 수정체상피세포와 접근이 쉬운 수정체확장고리를 이용한 억제기술이 연구되기 시작했다[25,26]. 특히 기초와 임상의 지적교류의 부족으로 문제점 접근이 어려운 실정은 세계적으로 보았을 때 마찬가지이므로 본 연구실에서 추구하고 있는 기초연구와 임상연구가 동시에 가능한 효율적인 연구실에서 집중적으로 연구가 수행될 경우 향후 국제적 경쟁력을 갖춘 결실을 맺을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구방법

수정체 상피세포의 변형, 사멸, 분화에 대한 연구를 생화학적, 분자세포생물학적, 유전학적인 방법으로 수행하여 세포내에서 일어나는 이러한 과정들을 총체적으로 이해하고 이를 바탕으로 효과적으로 저해할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

2. 연구내용

가. 변형된 세포에서 세포외 기질, 세포 표면 물질, 세포외 기질 분해효소, heat shock protein, growth factor의 발현 분석

나. Glycation된 세포외기질이 수정체상피세포의 변형에 미치는 영향조사

다. 변형된 세포에 특이하게 발현되는 새로운 유전자의 탐색

라. 세포변형 (epithelial mesenchymal transformation)을 initiate 할 수 있는 candidate gene의 screening

마. 수정체상피세포만을 선별적으로 사멸시키기위한 suicide gene의 검색과 그의 발현방법 개발확립

바. 유전성백내장환자와 전낭하백내장환자의 DNA확보

사. 안내장구를 이용한 물리적, 화학적 후발성백내장 억제기술

아. 수정체상피세포를 표적하는 lentiviral transfer 및 packaging vector system 제작

3. 연구결과

가. 세포외기질, cell adhesion molecule, protease, heat shock protein, growth factor의 발현분석.

(1) H_2O_2 에 의한 CTGF 발현: 수정체 상피세포의 변형 과정 중에 CTGF의 역할[27]

(가)내용:Connective tissue growth factor(CTGF)는 최근에 fibrosis를 일으키는 인자로 알려졌으며, 여러 세포외자극(TGF-β, dexamethasone, serotonin)에 의해 유도된다. 또한 세포 내 활성산소는 세포 외 자극으로부터 발생되며, 세포대사물의 부산물로서 생산된다. 이러한 세포 내 활성산소의 증가가 여러 질병을 일으킨다고 알려져 있으며, 그 중 CTGF의 발현을 증가시켜 백내장 형성을 야기하는 fibrosis에 초점을 두었다. (나)방법: 활성산소로 잘 알려진 H_2O_2를 농도별로 수정체 상피세포(Human lens epithelial cells, B-3)에 처리한 후 각각 RNA, 단백질을 추출하여 Northern blot 과 Western blot 분석을 수행하였다. (다)결과: H_2O_2를 처리하고 2-4시간에 단백질 수준에서 CTGF 발현이 증가하는 것을 확인하였다(그림 1). 또한 H_2O_2가 Fenton reaction에 의해 hydroxyl radical을 생성하기 때문에 이러한 CTGF 발현 증가가

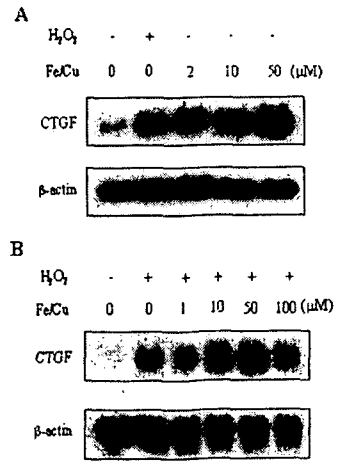

그림 1 Reactive oxygen species induced CTGF mRNA expression.

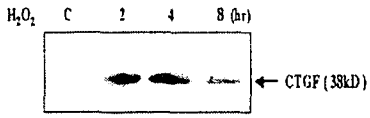

그림 2 CTGF was induced by hydrogen peroxide.

다른 활성산소에 의해서도 일어나는 지 확인하였다. Northern blot을 통해 hydroxyl radical에 의해서도 CTGF mRNA 발현이 증가하였고, H_2O_2와 함께 additive effect를 나타내었다(그림 2). 또한, 이러한 H_2O_2에 의한 CTGF 발현 증가가 어느 신호전달체계를 통하여 일어나는지 알아보았다.

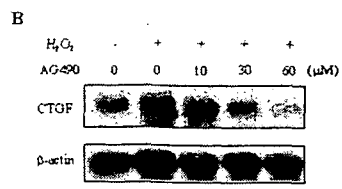

그림 3 JAK inhibitor, AG490, blocked CTGF induction.

활성산소에 의해 활성화되는 transcription factor인 STAT(signal transducer and activator of transcription)은 JAK(Janus kinase)에 의해 인산화되어 핵으로 이동한 후 CTGF를 포함한 여러 유전자의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 JAK의 억제제인 AG490을 H_2O_2와 함께 처리하여 Northern blot을 통해 조사하였다. JAK의 억제제인 AG490을 처리하였을 때 CTGF mRNA 발현이 농도에 현저히 비례하여 감소하였다(그림 3). 이것으로 미루어 볼 때 H_2O_2에 의한 CTGF 발현 증가가 JAK/STAT을 통해 일어나는 것을 알 수 있었다.

(2)TGF-β에 의한 세포변이 및 이동현상에서의 integrin alpha 6 의 변화[28]

(가)연구내용: 지난 2년동안 수정체상피세포에서 생물학적으로 중요한 여러 가지 growth factor나 cytokine을 처리한결과 단지 TGF-β1에 의하여 Integrin alpha 6 유전자가 mRNA 뿐만아니라 단백질의 level에서도 조절됨을 보여주었다. 특히 최근 몇 년간 integrin이 수정체의 분화과정뿐만 아니라 백내장에 중요한 역할을 하는 유전자인 연구결과를 살펴보면 본 연구에서 조절되는 integrin alpha 6의 역할은 백내장 및 후발성백내장의 형성에도 중요한 자료가 될 것이다. (나)방법: 수정체상피세포에 여러 가지 growth factor를 처리한후 몇몇중요한 integrin의 mRNA을 조사하였다. (다)결과: 그림 1의 RT-PCR data에서 볼수있듯이 여러 가지 growth factor 중 TGF-β1에 의하여 integrin alpha 6A의 level이 감소함을 보여주고 있다(그림 4). 이는 HLE B-3 cells 뿐만아니라 mouse lens epithelial cell (aTN-4)에서도 같은 결과를 보여주고 있으므로 이 현상은 수정체상피세포의 특이적으로 조절되는 작용임을 보여주고 있다. 이상의 결과에서 알수 있듯이 세포변이 및 이동에 중요하다고 알려진 integrin alpha 6의 TGF-β1에 의한 유전자의 변화를 알아보았다. 이는 세포와 세포 및 세포와 세포외기질 사이에 작용하는 수정체상피세포의 병리학적 혹은 발생학적 기전을 밝히는 중요한 자료가 될 것이다.

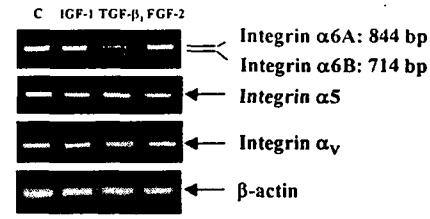

그림 4. Expression and modulation of integrin alpha 5, alpha 6, and alpha V mRNA expression by IGF-1, TGF-b1, and FGF-2.

(3)MMP-2 overexpression을 통한 수정체 상피세포의 변형과정 연구[29]

(가)연구내용: 수정체 상피세포의 변형과정에 MMP-2의 역할을 연구하였다. (나)방법: MMP-2 cDNA를 mammalian expression vector(pIRES)에 cloning하여 stable transf

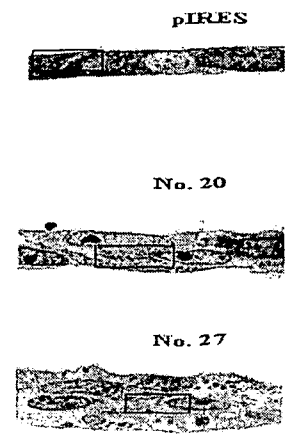

그림 5. Overexpressed MMP-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells.

ection하였고, MMP-2의 overexpression을 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 clone을 조사하였다. (다)결과: 31개의 clone중에서 MMP-2가 가장 많이 발현되는 2개의 clone을 selection하였다. 또한 selection한 No. 20, 27 clone은 zymography 상에서 active MMP-2가 발현되는 것이 확인되었다 (그림5).

(4)변형된 수정체상피세포에서의 a-crystalline 발현양상비교

(가)연구내용: Crystalins은 lens에서 발견되어지는 주요 단백질로서, 세 개의 주요그룹인 $\alpha\beta$그리고 γ-crystallin으로 나누어진다. α-crystallin는 αA와 αB 두 개의 polypeptide로 이루어져 있다. 이들 중 αB-crystallin은 neurodegenerative disease 혹은 brain tumor와 같은 어떤 질병들에 의한 스트레스에 반응해서 축적되어지고 또한 비정상적인 modification이 보고되었다. 이전의 보고에서 변형된 수정체 상피세포(AP)에서 αA와 αB-crystallin이 농축되어 있는 것을 확인하였고, 높은 분자량을 가진 α-crystallin이 ubiquitination 되어지는 것을 확인하였다. 아울러 two dimensional gel electrophoresis를 통해 변형된 세포에서 negative쪽으로 phosphorylation되어 있는 것을 확인하였다.

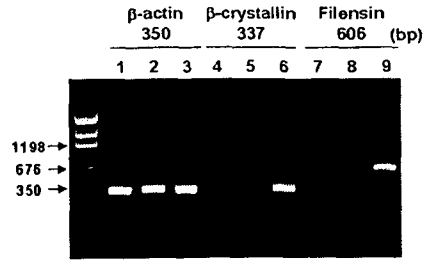

그림 6. Absence of mRNAs for fiber-specific proteins in lens epithelial cells from cataract patients.

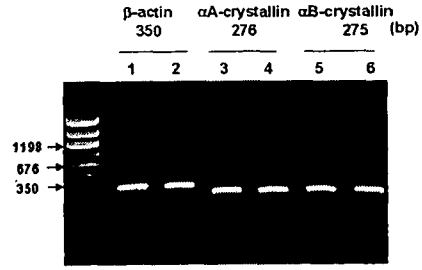

그림 7. The levels of α- and β-crystallin mRNAs were not changed in lens epithelial cells of anterior polar and nuclear cataracts.

따라서 본 연구에서 사용되어 온 lens epithelial specimen이 lens fiber 혹은 비정상적으로 증식된 fiber cell이 포함되어 있는지를 조사하였다. 또한 이전 결과에서 확인한 단백질 발현의 차이가 mRNA에서도 유사하게 일어나는지를 알아보기 위하여 RT-PCR analysis를 이용하여 anterior polar와 nuclear cataract에서의 αA-와αB-crystallin의 mRNA level를 조사하였다.

(나)연구방법: nuclear 또는 anterior polar cataract 환자의 anterior capsule에 부착된 lens epithelial cell을 이용하여 Western blot과 RT-PCR analysis 방법으로 α-crystallin protein과 mRNA을 분석하였다. (다)연구결과: 그림 6에서와 같이 β-crystallin과 filiensin mRNA의 발현이 positive control로 사용한 lens fiber에서 확인된 것과는 달리, lens epithelial cell에서는 검출되지 않았다. 이 결과를 통해 anterior polar cataract에서 anterior lens capsule에 고착되어진 대부분의 세포들이 lens epithelial cell임을 알 수 있었다. 두 종류의 cataract로부터 얻은 lens epithelial cell에서 mRNA가 유사한 수준으로 발현됨을 알 수 있었다(그림 7). 이들 결과로 anterior polar cataract로부터 얻은 lens epithelial cell에서 αA-와 αB-crystallin의 증가가 post-transcriptional level에서 조절되고 있음을 알 수 있었다.

(5)수정체상피세포의 변형과정에 amyloid β-(1-40)-BSA conjugate의 역할

(가)연구내용: Amyloid β aggregate가 TGF-β와 같은 cytokine activity와 백내장 형성을 야기하는 수정체 상피세포의 변형을 일으키는지 알아보기 위해 amyloid β-(1-40)을 BSA에 crosslink하여 여러 분자생물학적 방법을 통해 조사하였다. (나)방법: 우선, 조직재형성(tissue remodeling)과 세포이동(cell migration)에 관계하는 여러 가지 fibrotic makers(fibronectin, collagen type 1, smooth muscle actin)와 세포외기질(extra cellular matrix)을 분해하는 효소로 잘 알려진 MMP-2의 mRNA 발현을 조사하였다. 사람 수정

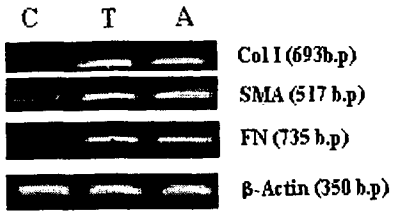

그림 8 Induction by amyloid β-(1-40)-BSA conjugates of FN, Col I and SMA mRNAs in lens epithelial cells.

체 상피세포 (Human lens epithelial B-3 cells)에 amyloid β-(1-40)-BSA conjugate를 200nM 처리하고, RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 fibronectin, collagen type 1, smooth muscle actin을 PCR하였으며, 또한

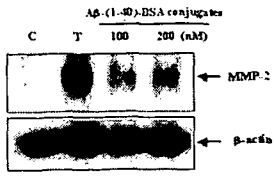

그림 9 Stimulation of MMP-2 mRNA levels by amyloid β-(1-40)-BSA conjugates in cultured lens epithelial cells.

MMP-2는 probe를 제작하여 Northern blot을 수행하였다. (다)결과: RT-PCR에서 amyloid β를 200 nM 처리했을 때 TGF-β(400 pM)와 같은 역할 즉, fibronectin, collagen type 1, smooth muscle actin과 같은 fibrotic marker들이 증가하는 것을 알 수 있었다(그림 8). 또한 잘 알려진 matrix metalloproteinase MMP-2 는 Northern blot을 통해 조사하였는데, amyloid β를 100nM, 200nM 처리하였을 때 MMP-2 mRNA 발현을 증가시켰으며 TGF-β(400 pM)는 positive control로 MMP-2 가 강하게 발현되는 것을 관찰하였다(그림 9). 이상으로 amyloid β aggregate가 수정체 상피세포 변형의 요인으로 잘 알려진 TGF-β와 같은 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

(6)Glycation된 세포외기질이 수정체상피세포의 변형에 미치는 영향조사[30]

(가) AGE에 의한 수정체상피세포의 영향

① 연구내용: 단백질은 알도우즈인 당류와 함께 Schiff base 형성과 Amadori 재전위를 통하여 비효소적으로 glycation이라는 변성 과정을 거치게 된다. 이 반응이 계속 진행되면 재전위, 고리화, 분열, 탈수와 산화 과정을 통하여 영구적으로 변성된 단백질인 최종 산물인 advanced glycation end products (AGEs)이 만들어지게 된다. AGEs는 형광성, 갈색화 발색, 단백질 상호 결합 등 특이적인 성질을 지닌다. 이러한 비효소 반응인 glycation은 collagen, crsystallin과 같이 오래 유지되는 단백질에서 진행되는 중요한 변성반응이며, 당뇨합병증, 백내장, 동맥질환과 치매의 발병기작에 관여할 수 있다는 보고들 이 잇따르고 있다. 사구체 의 mesangial cell에서 glycation시킨 BSA는 TGF-beta와 세포외기질의 구성성분들의 mRNA와 단백질 발현을 증가 시켰다. AGEs에 의한 receptor를 통한 TGF-beta의 증가는 세포외기질을 생성시키고 세포 성장을 변화시키는 기전의 하나로

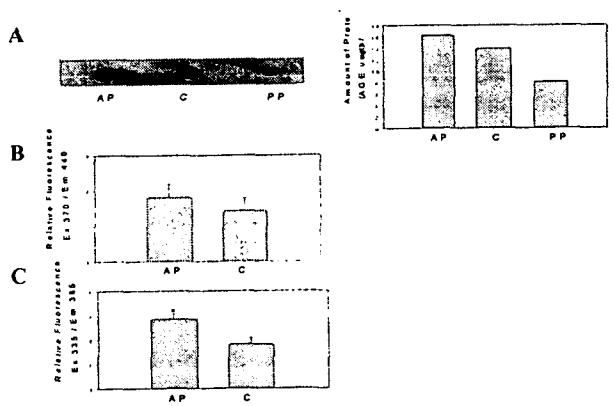

그림 10 Determination of AGEs in anterior polar capsules from anterior polar cataracts (AP) and cortical cataracts (C)/posterior polar cataracts (PP). (A) Capsular AGEs were determined by scanning densitometry of immunoblots: (I) Equal amounts (10 g) of solubilized proteins from the anterior lens capsules were dot blotted onto a nitrocellulose membrane, the membrane was incubated with AGE-specific polyclonal anti-AGE antibody [29], (II) Dot immunoblot assay was carried as described in Materials and Methods. (B) For fluorometric analysis, the three capsules were solublized using sequential digestion with collagenase and pepsin. Fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 370/440 and 335/385 nm, which detect general AGE formation and petosidine-related fluorescence, respectively. Values were corrected for the protein concentration of each sample. The extents of fluorescence (mean ± S.D.) are representative of five independent experiments. The *asterisk* denotes a *p* value of < 0.01.

설명되고 있다. In vitro 수정체 상피세포 explant를 통하여 TGF-beta는 alpha-smooth muscle actin (SMA), capsule wrinkling 과 collagen type I을 포함한 비정상적인 세포외기질의 축적을 보이는 방추체 모양의 세포 형성으로 수반되는 전낭에서 혼탁을 유도한다. 이는 human 전낭하 백내장과 백내장 수술 후 섬유화를 보이는 수정체 낭에서도 관찰되는 현상이다. 우리는 human 전낭에서의 AGEs의 존재를 처음으로 확인하려고 하고 상피 세포에 의한 변형과 세포외기질과 관련된 mRNA 및 단백질이 AGE로 매개되는 되는 지를 bovine 수정체 상피세포의 explant를 이용하여 보여 주려고 한다.

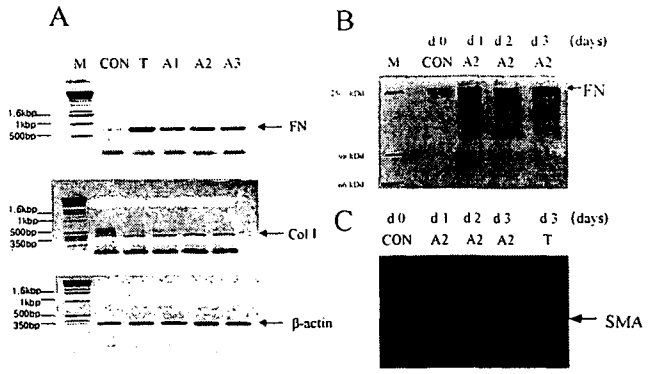

그림 11 Induction of AGEs of fibronectin (FN), collagen type I (Col I) and -smooth muscle actin (SMA) mRNAs and proteins in LECs. (A) Bovine lens epithelial explants were freshly prepared and cultured with or without AGEs (A1:50 g/ml, A2 : 100ug/ml, A3 : 200 g/ml) or with TGF-1 (10 ng/ml). After 20 hr, total RNA was isolated, and subjected to RT-PCR analysis to determine mRNA expression of extracellular matrix proteins. At the indicated time points, cell lysates were prepared from cultured bovine lens epithelial explants and assessed for FN accumulation (B) and SMA expression (C). Data shown is from one of two independent experiments that produced similar results. M, molecular size standards (base pairs A; kilodaltons B, C); CON, control cells; A, cells cultured with AGEs (A1:50 g/ml, A2 : 100 g/ml, A3 : 200 g/ml); T, cell cultured with TGF-1 (10 ng/ml).

② 연구방법

human 수정체 전낭의 제조. 수정체 낭과 그 밑에 붙어 있는 수정체상피세포를 백내장 수술을 한 환자로부터 얻는다. 제거된 수정체 낭은 액화 질소에 넣어 급속히 냉각시키고 RNA 및 단백질 회스를 위하여 -70°C에 보관한다. 이렇게 만들어진 전낭 임상 샘플들을 dot blot assay를 하기 위해 사용한다.

AGE-BSA의 제조. AGE-bovine serum albumin은 1 ml의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mg BSA, 25 mM glycolaldehyde and 1 mM DTPA를 넣어 살균 필터를 한 후 37°C에서 5일간 배양한다. 반응후 유리당은 투석을 통해 제거하고, control BSA는 같은시간 동안 glycolaldehyde없이 배양한다.

human 수정체 전낭 AGE 단백질양 측정. 10 μg 같은 양의 수정체 전낭 수용성 단백질을 nitrocellulose membrane에 점적하고 anti-AGE antibody로 하여 enhanced chemiluminiscence (ECL) kit로 정량한다. 일반적인 AGE 형성을 측정하는 fluorescence 검출법은 상피세포가 없는 낭으로부터 만든 샘플을 만든 후 정량화 한다. 일반적 AGE 형성은 excitation/emission wavelength 370/440 nm에서 pentosidine 관련 fluorescencesns 335/385 nm에서 fluorescence를 잰다. bovine 수정체 상피세포 explant의 처리. young bovine eye를 가지고 수정체 전낭만 채취하여 20% FBS를 함유한 DMEM 배지에 6-well plate에서 배양한다. 20시간 후 FBS가 없는 새 배지로 갈아준 후 50, 100, 200 μg/ml 의 AGE-BSA 또는 10 ng/ml 의 TGF-beta를 처리하여 준다. 정해진 시간 후에 세포 내 RNA와 cell lysate를 RT-PCR과 Western blot을 하기 위해 준비한다.

③연구결과

AGEs are detected in human anterior lens capsule from cataract patients. human 수정체 전낭을 백내장 샘플로부터 준비하여 10μg을 dot blotting 한다. 전낭성 백내장 (anterior ploar cataract;AP)는 16.3 AGE units/μg을 수질형 백내장 (cortical cataract;C)은 13.9 AGE units/μg을 후낭성 백내장 (posterior polar cataract;PP)는 8.8 AGE units/μg을 가지는 것으로 측정 되었다 (그림 10). AP로 부터의 fluorescence 값은 C로부터의 전낭을 비교하여 보면 370/440 nm와 335/385 nm에서 20%와 55% 증가하였다 (그림 11B and 11C).

Induction by AGEs of fibronectin, collagen type I and alpha-smooth muscle mRNAs and proteins

in lens epithelial cells. AGEs는 24시간 내 bovine explant에서 fbronectin (FN)과 collagen type I (Col I)의 mRNA 증가를 가져왔다 (그림 19A). Immunoblot analysis는 AGE가 bovine 수정체 상피세포에서 FN과 SMA를 축적시키는 것을 보여주었다 (그림 11B and 11C).

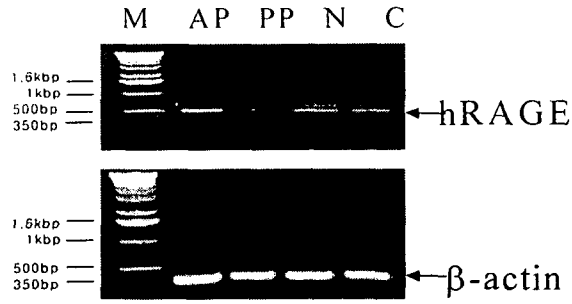

그림 12 Identification of human receptor for advanced glycation end products (RAGE) mRNA level in human LECs from AP, C, PP and N using RT-PCR. Total cellular RNA was isolated from LECs attached to four combined anterior capsules of human lenses for each clinical types of cataract. M, molecular size standards (base pairs).

(나) 수정체상피세포의 RAGE 조사

①연구내용

AGEs는 AGE 특이적 receptor들에 의해 세포 안으로 들어온다. 이들 receptor 중에서 35 kDa이고 immunogloblin superfamily에 속하는 receptor for AGEs (RAGE)라는 receptor가 현재 가장 연구가 많이 되어 있다. RAGE는 여러 세포에서 존재가 확인되고 있으며 $p21^{ras}$, MAP kinase, NF-kB와 cdc42/rac의 활성화와 같은 AGE 영향을 조절한다. RAGE와 그 ligand의 결합은 염증 반응, 혈관 장애, 치매, 종양 침범에 관련되어 있다. 우리는 human 전낭에 붙어 있는 상피세포에서 RAGE의 존재를 RT-PCR을 통해 확인하고 백내장에 따른 RAGE의 발현을 조사하고자 한다.

②연구방법

RT-PCR. Total RNA는 human 수정체의 전낭에 붙어 있는 상피세포로부터 TRIZOL reagent (Gibco BRL) 분리한다. One μg 의 RNA가 20-μl reaction mixture에서 kit (1st strand cDNA synthesis kit; Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, U.S.A.)을 이용하여reverse transcribed된다. cDNA (0.2 to 1μl)는 20-μl reaction mixture에서 증폭된다. PCR조건은 다음과 같다: 0.4 M each primer, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphate mixture (Perkin Elmer Corp., Foster City, CA), 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl2, and 1.0 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Gaithersburg, MD, U.S.A.). 반응혼합물은 thermal controller에서 (Model PTC-100; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) for 30 to 40 cycles (denaturation at 94oC for 45 s, annealing at 60oC for 30 s, extension at 72oC for 45 s)로 배양된다. 증폭된 생성물은 image documentation system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석한다. RAGE를 위한 primer sequences 는 다음과 같다:

③연구결과: RAGE mRNA의 발현은 다른 종류의 백내장보다도 AP에서 현저히 증가함을 볼 수 있다. 모든 경우에서 beta-actin의 발현은 일정하게 유지되었다(그림 12).

나. EMT에 관련된 생물학적기전연구

(1)변형된세포에 발현되는 새로운 유전자의 탐색

(가)연구내용:A disintegrin and Metalloproteinase (ADAM)은 disintegrin과 metalloproteinase의 domain을 모두 갖고 있는 membrane bound된 glycoprotein이며 세포의 adhesion 및 protease의 activity를 갖고 있다. Sperm과 egg의 fusion에 관련된다는 보고이외에 최근 ADAM유전자의 발현이 조직별 발생단계에서 specific하게 발현된다고 보고되고 있다. 여러 가지종류의 membrane bound 단백질의 release와 cleavage에 관련하는 ADAM의 성질을 고려하여볼 때, 전낭하백내장에서 보이는 abnormal한 세포외기질의 축적과도 관

련될것이라는 가정하에 몇몇 실험을 하였다. (나)방법:먼저 정상인 수정체상피세포와 백내장이 있는 수정체상피세포에 ADAM의 mRNA이 다르게 발현하는지 RT-PCR방법을 통해 살펴보았으며 또한 수정체상피세포에서 세포변형과 비정상적인 세포외기질을 만드는 TGF-b1을 처리한결과 조절되는 ADAM의 mRNA을 조사하였다.

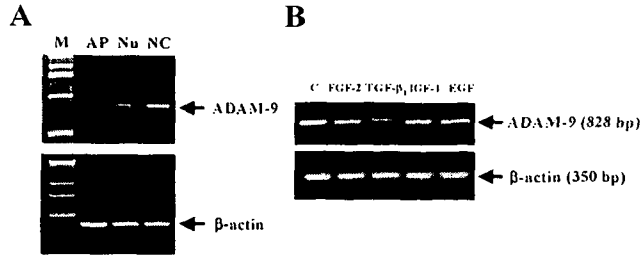

그림 13. Reduced expression of ADAM9 in human LECs of anterior polar cataracts and by TGF-b1 in human LECs.

(다)결과:그림 13에서 보이는 바와 같이 여러 가지 ADAM중 사람의 정상인 수정체상피세포에서는 ADAM9이 발현되었으며 세포의 변형에 의해 생긴 전낭하백내장에서 급격히 감소함을 보여주고 있다. 또한 수정체상피세포주(HLE B-3)를 이용하여 여러 가지 growth factor를 처리한결과 TGF-b1에 의해서 감소되는 양상을 보여주고 있다. ADAM9이 세포변형을 일으키는 TGF-b1에 의해 특이적으로 감소하는 결과와 변형된 전낭하백내장에서 감소하는 결과로 볼 때 세포변형에 의해 조절되는 또다른 유전자의 하나라고 사료된다. 하지만 실제로 ADAM과 TGF-b1이 in vivo에서 어떠한 mechanism에서 작용하는지는 더 연구가 필요하다.

(2)EMT에 관련된 생물학적기전연구

(가)연구배경: 상피세포(epithelium)는 정확한 방향성(polarity)을 지닌 세포이다. 이 정확한 방향성이 어느 자극에 의해 붕괴되면 세포의 변형을 일으키는 직접적 혹은 간접적인 원인을 제공하게 된다. 이러한 변형의 다른 형태로써 세포의 이동 증가 및 변형관련 유전자의 발현 촉진등이 일어난다. 이런 신호를 매개하는 물질의 후보로써 focal adhesion molecules를 예측할 수 있다. 우선, focal adhesion plaque에 가장 중요한 focal adhesion kinase(FAK)과 p130cas는 integrin에 의해 활성화된다는 것이 이미 알려져 있었는데, 최근엔 여러 성장인자(growth factors)나 hormones등에 의해서도 활성화됨을 밝히고 있다. 특히, p130cas의 경우 세포의 이동과 Immediate early gene expression에 중요한 역할을 한다는 점이 세포의 변형과 매우 유사한 면을 지니고 있다. 이에 본 연구자는 세포변형의 핵심 물질인 TGF-beta에 의해서도 p130cas의 활성화가 일어나는지를 관찰하였으며, 이러한 현상의 특이적 신호전달 체계를 확립하였다. (다)결과: 우선, immunoprecipitation과 western blot을 이용하여 TGF-beta에 의해서 p130cas의 tyrosine상에서의 인산화가 촉진됨을 확인하였고, 이러한 현상이 상피세포의 특이적 기전에 속한다는 것을 발견하였다 (그림 14). TGF-beta에 의한 p130cas의 인산화 촉진은 Src kinase에 의해 유발되고, 특히 TGF-beta에 의해서 Src kinase도 역시 활성화 촉진이 일어남을 kinase assay를 통해서 새로이 확인하였다(그림 15). 상피세포의 특이적 현상임을 규명하기 위해 섬유화 세포에 E-cadherin을 transfection하여 상피세포화를 유도하여 TGF-beta의 효과를 관찰한 결과, p130cas의 활성화가 상피세포화 되었을 때 촉진됨을 밝혔다. 더 나아가 E-cadherin mediate cell-cell interaction이 이러한 현상에 중요한지를 규명하기 위하여, E-cadherin에 대한 특이적 항체를 이용한 blocking assay를 통해, TGF-beta의 p

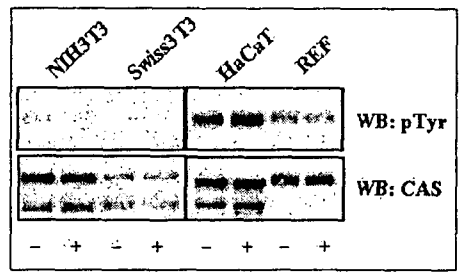

그림 14. Cell specific p130cas activation by TGF-beta HaCaT: Human skin keratinocyte REF: rat embryonic fibroblast Swiss and NIH 3T3: mouse fibroblast

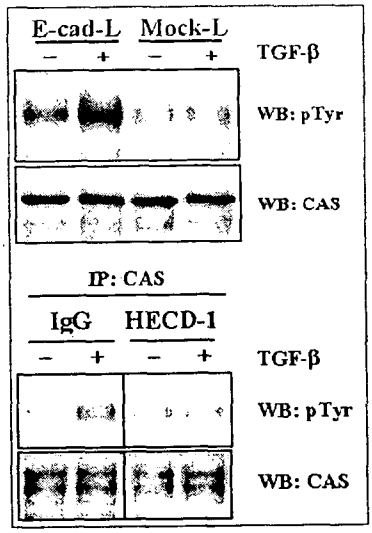

그림 15. E-cadherin mediate cell-cell interaction is essential to p130cas activation by TGF-beta

130cas 활성화 양상을 조사하였다. 그 결과, 세포간의 결합이 항체를 통해 억제되었을 경우, p130cas의 인산화가 촉진되지 않은 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 역으로 세포간의 결합이 TGF-beta에 의한 p130cas의 인산화에 필수조건임을 새로이 규명하였다(그림 16). 지금까지 TGF-beta에 의한 세포 변형에 수반되는 focal adhesion molecules의 인산화 조절 기전을 확립하였다. 이러한 연구결과는 또 다른 세포변형에 대한 기전연구에 획기적인 기초자료를 제공해 주는 것이다. 또한, 세포변형 억제제 개발에 대한 또 하나의 candidate를 제공해 줄 수 있으리라 희망한다.

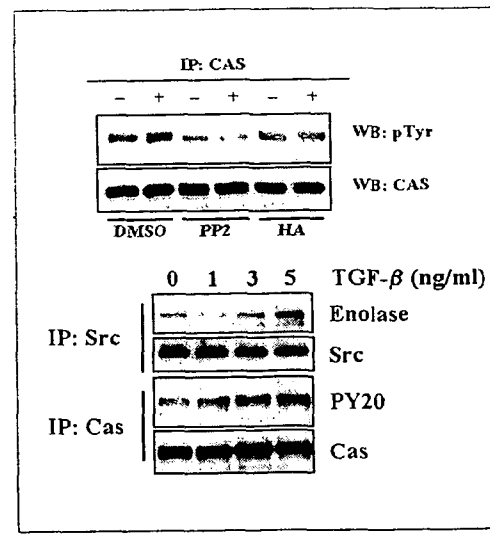

그림 16. Src kianse pathway is involved in p130cas activation and the activation of Src kinase by TGF-beta

다. 수정체상피세포만을 선별적으로 사멸시키기위한 suicide gene의 검색.

(가)연구내용: 후발성 백내장의 유전자 치료를 목적으로 수정체 상피 세포를 제거할 수 있는 세포사 유전자의 탐색을 진행하였다. (나)방법: 유전자의 탐색은 수정체 상피세포의 발생과 노화에 의한 수정체 상피 세포의 퇴화와 관련되어 있는 세포사 유전자를 탐색하였다. (다)결과: 세포사의 유도 유전자로는 가장 잘 알려 있는 p53, bax 그리고 강력한 세포사 유도 단백질로 알려진 caspase families (ICE, cpp32)등이 있다. 이러한 유전자들은 그 자체로서 세포사를 유도하기도 하지만 외부의 자극 즉, 자외선, oxidative stress, cytokine 등에 의하여 유도되기도 한다. 이들 외에 다른 세포사 유도 단백질은 pRB (retinoblastoma), 세포의 주기를 조절하는 p21,E2F1과 E2F2가 있으며, 이들은 transgenic animal 모델을 이용한 연구에서 수정체 상피세포가 퇴화가 증명되었다. RB는 tumor suppressor로 잘 알려져 있고, rb의 활성화는 caspase를 활성화시키는 것으로 보고되어 있다. 이러한 수정체상피 세포의 세포사 유전자는 다음그림 같이 유전자 치료를 위한 target gene으로 이용될 것이다(그림 17).

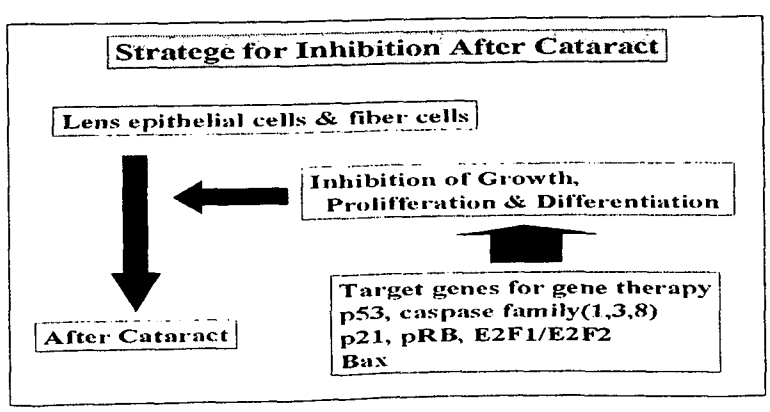

그림 17 . 후발성 백내장의 유전자 치료를 위한 세포사 유전자

라. 유전성백내장 및 전낭하 백내장의 유전인자 규명

(가)연구내용: 백내장에서 수정체상피세포의 변화는 전낭하백내장과 후발성백내장에서 연구가 되고 있는데 전낭하백내장의 경우 외국에서는 그 빈도가 낮은데 (2-3%미만) 비해 우리나라는 15%정더러 추산되고 있다. 후발성백내장의 경우 약 20-50%의 빈도를 보이는데 이는 세계적으로 비슷하다. 유전성 백내장의 경우 17개의 loci가 알려져 있으며 5개의 원인유전자가 보고되어있다. 이는 유전성 백내장의 heterogeneity를 나타내는 것이다. (나)방법: 최근 본 연구실에서 zonular, sutural 혼탁을 보이는 유전성 백내장 가계를 확보하였고 이러한 형태를 보이는 백내장이 최근 beta-crystallin A3/A1 gene의 변형에 의한 것이라고 발표되었다. 따라서 본 연구실에서 확보한 환자 가계를 대상으로 유전자의 변형을 확인하고자 하였다. 또한 프로젝트의 진행중 화학연구소의 송창우 박사님으로부터 유전성 백내장 마우스 모델을 이용하여 그 기전을 확인하고 하였다. (다)결과: 지난 연구기간동안 아래 표에서 보듯이 전국적으로 백내장 뿐 아니라 다양한 안 질환에서 유전성 질환을 확인하고 그들의 DNA를 확보하였다. 위에서 언급했듯이 확보된 DNA를 이용하여 선천성 백내장의 원인유전자를 찾고자 하였다. 그 결과 아래 그림에서 보듯이 zonular 그리고 sutural 혼탁을 보이는 가계를 확보하였고, beta-crystallin A3/A1 gene의 염기서열 분석을 한 결과 어떠한 돌연변이도 확인할

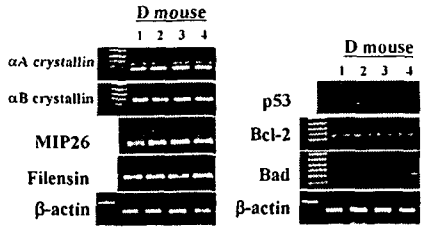

그림 18. RT-PCR analysis of Cataractous mouse lens by a-crystalline, MIP26, Filensin, p53, bcl-2, and Bad primers.

Type	강남성모	중대용산	현대중앙	강동성심	여의도성모	충북대	연세대	영남대	분당차병원	길병원	효성가톨릭대	서울대	원광대	Total
Cornea														
amyloidosis after penetrating keratoplasty	1													1
Behcet's Dystrophy	1													1
Blepharophimosis								7						7
Congential Stromal Dystrophy											1			1
Cornal opacity after LASIK	1													1
Finger Print map Dystrophy	1													1
Fuch's Dystrophy	3													3
Granula Dystrophy	16	4		1	2		2		2	6				33
Keratoconus	18										2	1		21
Lattice	2	1	2		2				1					8
Macular Dystrophy	2	1								1				4
Mucopolysaccharidosis												1		1
PPMD	1													1
Preb's Dystrophy						1								1
Reis Buckler Dystrophy	2									1				3
기타	8	2			2			1					2	15
Lens														
Cataract	85													85
Congenital Cataract	25										8	25		58
Retina														
Retina pigmentosa	1													1
Steroid induced glaucoma	2													2
Usher syndrom	2													2
Total	171	8	2	1	6	1	2	8	3	8	11	27	2	250

그림 19. 국내의 백내장을 비롯한 유전성 안질환관련 DNA의 확보상황표

수 없었다(그림 18).

따라서 원인 유전자를 찾고자 그림 21에서 보여주듯이 SSLP를 이용한 linkage analysis를 진행중에 있다. 또한 백내장의 원인 유전자 규명에 있어 동물모델을 이용할 수 있는데 화학연구소의 송창우 박사님으로부터 제공받은 마우스 백내장 모델을 통해 다양한 원인을 갖는 백내장 발생 기전을 확인하고자 하였으며 이를 위해 전자현미경적 고찰과 분자생물학적으로 수행하였다. 그 결과 본 연구에서 사용된 백내장 마우스모델의 주 요인

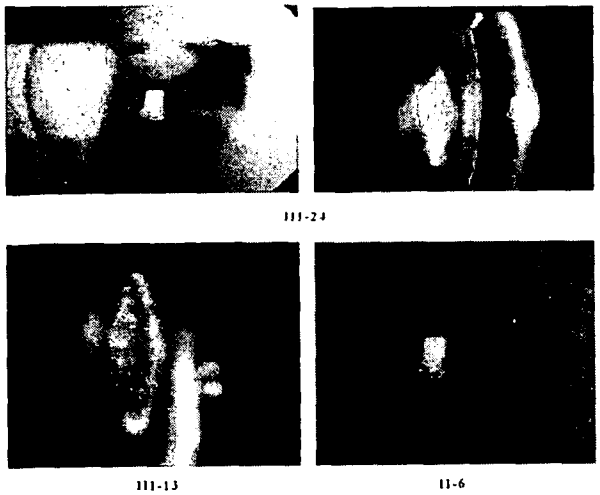

그림 20 유전성백내장가계의 가족중 백내장을 보이는 환자의 slit lamp사진. 수정체에의 zonule 부위와 suture 부위에서 혼탁을 보이고 있다.

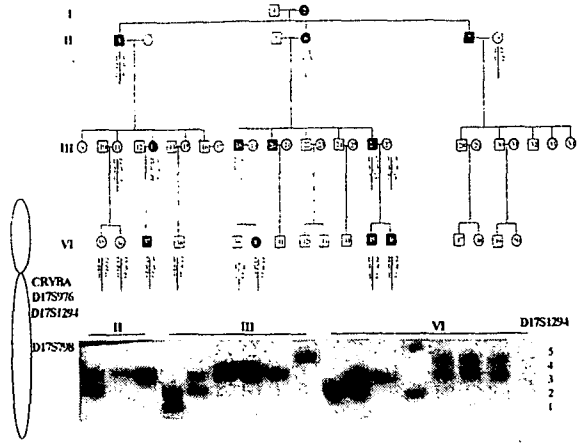

그림 21 CRYBA유전자를 중심으로 Chromosome17에 위치하는 microsatellite marker D17S1294, D17S976, D17S798을 사용하여 SSLP analysis를 통한 linkage analysis

은 공포(vacuole)가 생기는 것이며 이와 함께 수정체 상피세요의 사멸을 관찰 할 수 있었다. 이를 바탕으로 지금까지 알려진 백내장의 원인유전자와 세포사멸에 관련된 유전자의 발현 양상을 RT-PCR을 통해 관찰하였다. alpha-crystallin, MIP26, Filensin, p53, Bcl-2, Bad의 mRNA 발현 정도에는 차이가 없었다. 단지 1차 보고에서 언급했듯이 MMP-2 단백질 발현정도가 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다.

마. 안내장구를 이용한 물리적, 화학적 후발성백내장 억제기술

(1)최근 후발성백내장연구에 있어서 각광받고 있는 In vitro capsular bag model의 확립.

(가)<u>연구내용:</u> 지금까지 알려진 후발성백내장의 기전으로는 수술후 적도부나 전낭에 잔존하는 수정체상피세포의 후낭에서의 증식 및 이동, 섬유아세포와 유사한 세포로 이형성

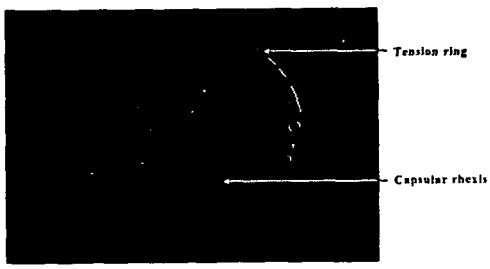

그림 22. Capsular bag with implanted tension ring

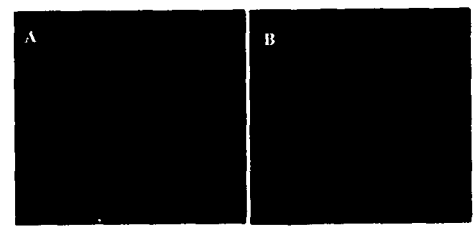

그림 23. DAPI-stained nuclei of cells on posterior capsule

(metaplasia) 그리고 수정체상피세포에서의 비정상적인 collagen섬유합성 등으로 인한 후낭혼탁으로 설명되고 있다. In vitro capsular bag model은 적도부나 전낭에 위치한 수정체상피세포를 수정체 후낭 위에 배양시키는 방법으로 다른 방법에 비해 후낭과의 연관성이 유지되는 등의 장점으로 인해, 최근 후발성백내장연구에 있어서 각광받고 있다.

<u>(나)방법:</u> 도살장에서 구입한 신선한 돼지안구를 이용하여 각막 윤부에 절개를 가하여 각막을 띄어내고 수정체 전낭절개를 실시한 후 수정체를 초음파유화흡입기를 이용하여 제거하였다. 남은 피질은 관류 및 흡입술을 이용하여 제거하고 낭내에 PMMA으로 구성된 고리로 수정체낭 확장고리를 이용하여 수정체낭을 이용한 후발성백내장 모델을 만들었다. Capsular Bag Model은 DMEM Media에 온도 37℃, 5% CO_2 농도에서 serum이 없이 배양

하였다. (다)결과: 낭내에 PMMA으로 구성된 고리로 국내 제조 회사인 루시드 코리아에서 제작한 제품인 수정체낭 확장고리를 이용하여 수정체낭을 이용한 후발성백내장 모델을 만들었다.(그림 22) 수정체 후낭 부분에서의 세포가 증식여부를 Dapi로 염색한 결과 배양 후 하루가 지난 다음 과 비교하였을 때 배양 후 15일 지나면 후낭의 세포가 증가하였다.(그림 23).

(2)Lentiviral vector를 이용하여 lens epithelium 세포들만을 선택적으로 제거(cell ablation) 하는 유전자 치료법을 개발하기 위한 수정체상피세포 선택적인 recombinant virus를 제작.

(가)연구내용: Lentiviral vector를 이용하여 lens epithelium 세포들만을 선택적으로 제거(cell ablation) 하는 유전자 치료법을 개발하기 위한 제 1 단계 연구개발로서 사용되어질 각막세포 선택적인 recombinant virus를 제작하기 위해 아래와 같은 방법으로 단계적으로 수행하였다.

(나)연구방법:

① Packaging vector, target vector, transgene vector의 제작

후천성 백내장 치료를 위해 사용될 또는 원하는 gene을 효율적으로 전달하기 위해 사용되어질 HIV-1을 기초로 이들 단백질들을 이용한 recombinant virus를 제작하였으며, 이를 위한 첫 번째 단계로서 HIV-1의 *env*을 제외한 나머지 단백질을 발현하는 Packaging vector인 pCMVHIV(Δenv) 제작하였다. 또한 hiv의 envelope protein을 대신하여 mammalian cell 내에서 VSV(vesicular stomatitis virus)-G protein을 발현시킬수 있는 vector인 pCE4g를 제작하였다. 세 번째로, HIV의 LTR promotor에 의해 *LacZ* gene이 세포 내에서 발현과 recombinant virus 안으로 packaging될 수 있는 vector인 pLCMV1acZL을 제작하였다. (Figure 24)

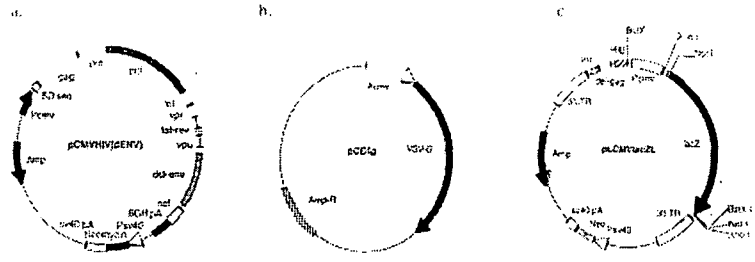

그림 24. Construction of HIV based vectors for the recombinant virus expression. a. packaging vector, b. target vector, c. transgene vector.

② Transfection 조건 및 recombinant HIV-1 virus의 분리

recombinant virus를 얻기위해서, 위에서 만들어진 세 가지 vector들을 293T cell에 transfection시켰다. transfection하기 하루 전날 6-well plate에 well당 3×10^5(약 70% confluency)의 293T cell을 넣어준 다음 약 16시간동안 incubator(5% CO_2, 37℃)에서 배양시켰다. 그 다음 위의 세가지 vector들을 well당 각각 0.5μg씩 섞은 다음 200μl의 serum-free media와 섞어주었다. 위의 DNA-media mixture를 만드는 동안, 동량의 serum-free media에 5μl의 Lipofectamine(Gibco BRL Co.)을 넣은 다음 약 5분간 incubation하였다. 그 후 위의 두가지 mixture를 섞어준 다음, 다시 30분간 실온에서 incubation시켰다. 위의 mixture를 다시 600μl의 serum-free media와 혼합하였다. 그 다음 6-well에 준비해 놓은 293T cell의 배지를 제거시킨 다음 이 DNA-Lipofectamine mixture를 넣어주었다. 이것을 각각 8일, 10일, 12일 14일동안 incubator(5% CO_2, 37℃)에서 배양시킨 다음 배양액에서 상등액만을 추출하여 recombinant virus를 분리하였다.

③ Recombinant virus의 infection과 β-galactosidase의 발현확인

Recombinant virus가 제대로 생성되었는지 확인하기 위해서, 위의 배양액에서 상등액을 각각 추출하여 6-well에 50% confluency로 준비된 293T cell에 infection시킨 다음 incubator(5% CO_2, 37℃)에서 1일간 각각 배양하였다. 이 배양액에서 virus가 제대로 생성된다면 transgene vector내의 *LacZ* gene에서 β-galactosidase가 발현될 것이기 때문에 β-galactosidase의 발현여부를 확인하기 위해서 X-gal staining을 실시하였다. staining한 결과 mock transfection된 well에서는 staining이 되지않은 반면, 8일째 추출한 recombinant virus에서는 약 10%, 10일째에는 약13%, 12일째에는 31%, 14일째에는 약 70%가량 X-gal에 staining되는 infection efficiency를 나타내었다.

(Figure 25)

④ α-crystallin promoter를 가지는 transgene vector의 제작

lentivirus 유래한 recombinant virus에 의해 각막세포에서 특이적으로 원하는 유전자를 발현시키기 위한 첫 단계로 α-crystallin promoter를 이용하여 β-galactosidase가 발현되는 recombinant virus를 만들기 위해 이에 필요한 transgene vector를 제작하였다.

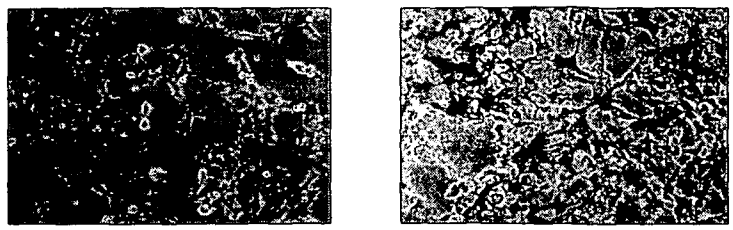

그림 25. X-gal staining of 293T cells infected hiv-based recombinant virus A. mock infected B. recombinant virus infected.

먼저 α-crystallin promoter를 함유하고 있는 vector인 CPV-6를 Not I과 EcoR I을 이용하여 약 1100bp의 α-crystallin promoter fragment를 분리한 다음 Klenow enzyme을 이용하여 5'과 3'을 blunt-end로 만들었다. 그 다음 *LacZ* gene을 함유하는 vector인 pcDNA3.1/His B/*lacZ*(Invitrogen Co.)에서 *Nru* I과 *Hind* III를 이용하여 CMV promoter를 제거한 다음, 위에서 분리한 α-crystallin promoter와 blunt-end ligatin을 하였다. 이렇게 만들어진 vector를 pCPV-*lacZ*라고 명명하였다. 이것을 다시 transgene vector에 옮기기 위해 pCPV-*lacZ*를 *Bgl* II와 *Xho* I을 이용하여 약 4000bp의 α-crystallin promoter-*lacZ* fragment를 분리하였다. 이것을 II에서 만들어진 pLpsiRL의 *EcoR* I site에 blunt-end ligation을 하였다. 이렇게 만들어진 vector를 pLCPVlacZL 이라고 명명하였다(Figure 26).

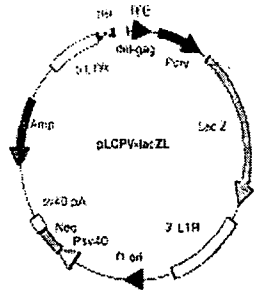

그림 26. Construction of Transgene vector (pLCPV-*LacZ*-L).

⑤ α-crystallin promoter의 cell-type specificity 결정

α-crystallin promoter가 각막세포에서 특이적으로 발현, 작용하는지를 확인하기 위하여, 위에서 만들어진 pCPV-*lacZ*를 이용하여 β-galactosidase의 발현여부를 확인하였다. 먼저 각막세포인 HLE-B3 cell-line과 control로서 293T cell을 6-well plate에 각각 50%와 70% confluency로 배양하였다. 그 다음 위의 pCPV-*lacZ*와 control로써 CMV promoter를 가지고 있는 pcDNA3.1/His B/*lacZ*를 HLE-B3 cell과 293T cell에 각각 Lipofectamine을 이용하여 transfection한 다음 incubator(5% CO_2, 37℃)에서 배양하였다. 2일간 배양한 다음 X-gal staining solution을 넣고 β-galactosidase가 발현되는지 확인하였다. 먼저 control로써 사용한 293T cell에서는 pcDNA3.1/His B/*lacZ*가 transfection되었을 경우에는 약 70%의 X-gal staining이 되었고, pCPV-*lacZ*가 transfection되었을 경우에는 약 1%미만의 staining결과가 나왔다. 그리고 각막세포인 HLE-B3 cell에서는 pcDNA3.1/His B/*lacZ*가 transfection되었을 경우에는 약 50%의 X-gal staining이 되었고, pCPV-*lacZ*가 transfection되었을 경우에도 약 50%의 staining결과가 나왔다. 위의 결과로 α-crystallin promoter가 293T cell에서는 발현이 안되고 HLE-B3 cell에서는 발현이 잘 되므로 α-crystallin promoter는 각막세포에 특이적으로 발현이 된다는 것을 확인하였다. 이들 system을 이용한 각막세포 선택적이며 효율적인 유전자 전달 및 발현할 수 있는 lentivirus 유래 recombinant virus를 성공적으로 제작하였다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발목표 달성도

연도	세부연구목표	달성도(%)	달성내용
'99	수정체상피세포의 증식, 이동, 변형, 세포사에 대한 기전연구	100%	후발성백내장의 분자생물학적 및 생화학기전을 이해하였다.
	유전성 백내장의 세포 변형 유전인자 탐색	100%	- 수정체상피세포만을 선별적으로 사멸시키기 위한 suicide gene의 검색과 그의 발현 방법 개발 확립. - 국내외 국공립 및 사립병원과의 교류를 통한 DNA 확보 및 분자의과학연구소와의 자문수행.
	수정체상피세포 특이적 발현 suicide gene(s) 검색 및 확보	100%	SCI 논문게재 및 수정체 상피 세포를 제거할 수 있는 세포사 유전자의 탐색을 진행하였다.
	후발성 백내장의 억제기술에 대한 전략확립	100%	수정체상피세포의 변형, 증식, 이동에 의한 후발성백내장에 대한 억제책으로 유전자치료의 방법과 약물치료의 전략을 확립하였고 산업연구소와 협력거점확보
'00	수정체상피세포의 증식, 이동과 변형의 억제책개발	100%	후발성백내장관련된 기전을 세포외기질, integrin, growth factor의 발현에 관련한다는 연구내용을 SCI논문에 게재하였다.
	EMT에 관련된 생물학적기전규명	100%	2편의 SCI 논문게재요청중이며 연구교류회를 개최하였다으며 전문기술세미나를 개최하였다.
	유전성백내장의 mutation 규명	100%	서울대 소아 안과와 함께 다양한 선천성 백내장 환자를 확보하고 DNA를 분리 및 저장하고 있어 차년도에는 유전자치료의 candidate 유전자의 screening에 도움이 될것이며, 확보된 DNA로 SCI 논문에 게재예정이다.
	인공장구를 이용한 물리적, 화학적 후발성백내장억제책강구	100%	차년도의 물리적화학적 억제책에 필요한 In vitro model과 ex vivo (in vivo)의 후발성백내장 모델이 확립되었다.
	수정체상피세포 표적 lentiviral vector system 개발	100%	수정체상피세포만을 선택적으로 transduce하는 lentivirus vector가 개발되었다.
종합	수정체상피세포의 변형, 증식 및 이동에 의한 후발성백내장의 기전연구 및 억제책강구.	100%	1단계연구를 통하여 후발성백내장 질환에 대한 보다 명확한 이해가 되었으며 이를 세포의 변형에 관계하여 새롭게 발현되는 세포외기질에 대한 연구는 국내의 여러 ECM연구자들과의 consortium 구성이 되었다. 이는 2 단계연구과제를 수행할 수 있는 밑거름을 확보하였고, 세표변형에 관한 유전자조사 및 신호전달체계를 조사를 통해 postgenome 시대를 맞이하여 중요한 기초자료가 될것이다. 더욱이, 수정체상피세포를 표적하게 제작된 lentiviral vector 및 인공장기를 이용한 약물전달시스템의 시스템구축은 본 연구실에서 구축하고자하는 기초연구와 실제 임상적용까지의 실용화의 가능성을 보여주고있다.

2. 관련분야의 기술발전에의 기여도

가. 본 연구실의 주천기 교수팀은 한국형 수정체낭 안전링을 개발하여 그 우수성이 인정되어 2000년 10월 4일 제46차 IR52 장영실상(과학기술부 장관상)을 수상하였으며 이는 백내장 수술 후 후발성 백내장의 억제와 최근 문제가 되고 있는 수정체낭 절개면의 수축을 방지할 수 있게 되었다. 한국형 수정체낭 안전링은 광범위한 임상실험을 통해 높은 효과가 확인되었으며(SCI 논문2편게재), 그동안 고가로 수입에 의존해 왔던 것을 국내((주)루시드코리아)에서 개발함으로써 수입 대체는 물론 수출에도 기여하게 될 것으로 기대된다.

나. 세포 변형의 주요 원인과 결과인 세포외 기질(extracellualr matrix, ECM) 연구회를 본 연구실이 주관되어 창립하였으며 시과학에 대한 연구를 국내에서 보다 체계적으로 하기 위하여 기초안과 및 시과학 연구회(Basic Ophthalmology & Vision Research Club, BOVRC)를 출범하는데 주도적인 역할을 하여 국내의 연구자들이 서로 지식과 정보교환을 하는 마당을 제공하였다.

다. 본 연구실에서 보유하고 있는 여러 수정체 상피 세포(B3 cell line (human), SRA (human), alpha-TN4(mouse), N/N1003A(rabbit))를 눈과 관련된 연구 및 EMT 연구 중인 광주과기원의 라이겐드 연구단과 2001년 국가지정연구실로 선정된 경북대학교 생화학교실 김 인산 교수님에게 제공하였다. 또한 연구의 도움을 위해 ECM 연구회 등을 통해 계속적인 상호 연구협력중이며, 지난 2년여 동안 전국적으로 그 빈도수가 많지 않은 유전성 안 질환을 확인하고 환자들로부터 genomic DNA를 본 연구실에서 저장하고 있다. 이를 이용하여 연구하고 하는 연구자에게 DNA를 일부 제공하였으며 본 연구실에서도 이를 이용하여 corneal dystrophy에서 돌연변이를 확인하였고 2002년 SCI journal인 Cornea에 개재되었다[31].

3. 연구결과(개발기술)의 활용계획 및 활용가능성

1단계의 연구결과로 후발성백내장 질환에 대한 보다 명확한 이해가 되었으며 이를 토대로 하여 변형된 상피세포에서 발현되는 단백질들과 이들 세포에서 탐색된 새로운 유전자가 후발성 백내장에 있어 어떠한 역할을 하는지를 보다 명확히 규명하고 제작된 lentiviral vector component 들을 이용해 수정체상피세포를 표적하는 유전자치료시스템을 구축하리라 사료된다. 세포의 변형에 관계하여 새롭게 발현되는 세포외기질에 대한 연구는 국내의 여러 ECM연구자들과의 consortium 구성이 되었으며 후발성백내장 뿐만 아니라 간경화등 다른 질환으로의 응용가능성을 여러 차례에 걸친 심포지엄과 연구회를 통하여 알게되었다. 그리고 유전성 백내장환자와 전낭하백내장 환자의 DNA 확보를 통하여 유전성 백내장의 mutation을 규명하고 이에 바탕을 둔 유전자 치료에 관한 연구는 2단계연구과제를 수행할 수 있는 밑거름을 확보하였다. 또한 세표변형에 관한 유전자조사 및 신호전달체계를 조사를 통해 postgenome 시대를 맞이하여 중요한 기초자료가 될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 2단계 연구의 필요성

2단계 연구에서는 1단계 기초연구에 토대를 두어 drug delivery system 구축과 유전자치료의 gene targeting을 위한 핵심기술의 확립에 있다. 최근 분자생물학의 발전으로 여러종류의 안질환에 대한 기전이 밝혀지고 있으며 가까운 미래에는 이러한 연구에 토대를 둔 유전자 및 bioactive 단백질을 포함하는 치료방법이 대두될것다. 하지만 아직까지는 이러한 치료 및 억제방법이 임상적으로 눈을 target으로 하는시도는 시기상조이다. 그리하여 biodegradable polymer를 사용하여 눈의 약물전달체계를 연구하는 것은 꾸준히 연구해야될 과제이다[32-34]. 그리고 특이적인 수정체상피세포의 기능저하, 유전자 target, cytokine에 대한 면역 억제요법 등을 수정체확장고리나 인공수정체를 약물전달시스템에 이용하는 연구기술의 집중적인 투자가 절실히 필요한 실정이다[35,36]. 이러한 추세로 볼 때 biodegrdable한 polymer를 사용함으로써 생체내에 자연적으로 흡수되게하는 DDS 기술은 나아가 제약회사연구소에 기술합작으로 약제를 이용한 억제방법으로 유전자기술의 기반확립은 진단 kit과 억제기술억제방법으로 발전시킬것이다. 특히 본 연구실은 기초연구 뿐만아니라 응용과학과의 접목을 시도하고있으며 현재 본 대학에 근무하고 있는 gene targetting 전문가 유지창교수와 분자유전학의 김성주교수는 1단계에 이어 계속 긴밀한 협력관계를 유지할 것이다[37]. 또한 지난 2년간 본 연구실과 긴밀한 관계를 가진 (주)루시드코리아와 약물전달시스템의 (주)biopolymed와의 연구교루는 2단계의 연구수행에 있어 병행되어야 할 것이다. 특히 기초와 임상의 지적교류의 부족으로 문제점 접근이 어려운 실정은 세계적으로 보았을 때 마찬가지이므로 본 연구실에서 추구하고 있는 기초연구와 임상연구가 동시에 가능한 효율적인 연구실에서 집중적으로 연구가 수행될 경우 한 걸음 빨리 국제적 경쟁력을 갖춘 결실을 맺을 것이다.

2. 타연구에의 응용가능성 및 기업화 추진방안

본 연구실에서 구현된 1단계의 후발성백내장의 분자생물학적, 생화학적인 기전은 앞으로 3년간 실행하게될 약물전달시스템기술과 유전자치료기술 구축과 더불어 국내의 기술이 국제적으로 선도하리라 추진함에 있다. 특히 제약회사에 DDS의 기술을 전략적제휴 및 전수함과 생명공학연구소와 제약연구소에 targeting vector를 이용하여 후발성백내장을 억제방법을 확고히 구축하고자 함에 있다. 이 연구에서 파생되는 후발성백내장 억제기술은 제약회사연구소에 차후 이전하여 약제를 이용한 효과적인 억제방법으로 병을 유발하는 유전인자의 이상발견은 산전검사는 유아때의 조기진단에 이용하는 진단 kit과 억제기술로 발전시킴에 있다. 이러한 기술집약적인 기술은 국내외 특허를 통하여 국가출현연구소나 산업체연구소에서 양산체제로 개발할수있도록 권장하고자한다. 특히 21세기의 과학이라 불리우는 생명공학기술의 실현가능한 사업의 일환으로 국가경쟁력을 높여 국가의 위상을 높임에 이바지하고자한다.

제 6 장 참고문헌

1.1997 의료보험통계연보 (제 20 호), 의료보험연합회, p422, 1998.

2.신경환외 8명. (1992) 노인성 배내장의 위험인자 및 환경요소에 대한 역학적 연구: 인구를 기초로 한 역학 조사, 한안지 33:834-843.

3. JM. Pakic, A. Galano, GIJS F. J. M. Vrensen. Lens epithelial: cell prolferation posterior capsule opacification specimens. Exp. Eye Res. 2000;71:489-494.

4. F van Gauwenberg, J-M Rakic, A. Garland. Complicated posterior capsulorhexis: aetiology, management, and out come. British journal of ophthalmology, 1997;81:195-198.

5. J.M. Pakic, A. Galand, GIJS F. J. M. Vrensen. Lens epithelial cell proliferation in human posterior capsule opacification specimens. Exp. Eye Res. 2000;71:489-494.

6. D.S friedman, D. D. Duncan, B. Munoz, S.K. Weat, O. D. schbeti. Digutal image capture and automated analysis of posterior capsular opacification. IOVS 1999;40:1715-1726.

7. S.A. Barman, E.J. Hollick, J.F Boyce, D.J. Spalton, B. Uyyanonvara, G. Sanguinetti, W. Meacock. Quqntification of posterior capsular opacification in digital images after cataract surgery. IOVS 2000;41:3882-3892.

8. Andrew Commbers, Helen Seward. Posterior capsular opacification prevention: IOL design and
material. Br J Opthalmol 1999;83:640-641.

9. B.C. Coudere, S.de Neuville, V. D-Echinard, B. Serres, S. Manenti, J-Marie Darbon, F. Malecaze. Retrovirus-mediated transfer of a suicide gene into lens epithelial cells in vitro and in an experimental model of posterior capsule opacification. Current Eye research 1999;19:472-482.

10. F. Malecaze, B. Couderc, S.D. Meuville, B. Serres, J. Mallet, V. Douin-Echinard, S. Manenti, F. Revah, J.-D. Darbon. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: Feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. Human gene therapy 1999;10:2365-2372.

11. J.M. Wormstone, C.S.C. Liu, J-M. Rakic, G.M. Marcantonio, G.F.J.M. Vrensen, G. Duncan. Human lens epithelial cell proliferation in a protein-free medium. IOVS 1997;38:396-404.

12. G. Duncan, I.M Wormstone, P.D. Davies. The aging human lens: Structure, growth, and physiological behaviour. British journal of opthalmology. 1997;81:818-823.

13. W. R. Meacock, D. J. Spalton, M. R. Stanford. Role of cytokines in pathogenesis of poeterior capsule opacification. British journal of ophthalmology 2000;84:332-336.

14. JM Marcantonio, Jean-Marie Rakic, Gij FJM Vrensen, and George Duncan. Lens cell populations studied in human donor capsular bags with implanted intraocular lenses. Investigative Opthalmology and Visual Science. April 2000, Vol 41, No 5:1130-1141.

15. Antonio Calballero, Jose Maria Marin, Magdalena Slinas. Spontaneous regression of Elschnig pearl
posterior capsule opacification. J Cataract Refract Surg Vol 26, May 2000:779-780.

16. J-M Rakic, A.Galand, G.F.J.M. Vrensen. Separation of fibres from the capsule enhances mitotic activity of human lens epithelium. Exp. Eye Res. 1997;64:67-72.
17. E. J. Hollick, D. J. Spalton, P. G. Ursell, M. V. Pande. Lens epithelial cell regression on the posterior capsule with different intraocular lens material. British journal of ophthalmology 1998;82:1182-1188.
18. WR Meacock, DJ Spalton, MR Stanford. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification,. Br J Opthalmal 2000;84:332-336.
19. S. Tamiya, I.M. Wormstone, J.M. Marcantonio, L. Gavrilovic, G. Duncan. Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens. Exp. Eye Res. 2000;71:591-597.
20. T. Nagamoto, G. Eguchi, D.C. Bebee. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. IOVS;41:1122-1129.
21. F. Boscia, I. Grattagliano, G. Vendamiale, T. Micelli-Ferrari, E. Altomare. Protein oxidation and lens opacity in humans. IOVS 2000;41:2461-2465.
22.Freezzotti R and Caporossi A(1990). Pathognesis of posterior capsule opacification: Part I. Epidemiological and clinicostatisitical data. J Cataract refract Surg 16:347-352.
23.Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Verma IM, Trono D Science.* 272(5259) : 263-7
24.Nishi O (1999) Posterior capsule opacification. Journal of cataract & Refractive Surgery; 25(1): 106-117.
25. W.W. Hauswirth, L. Beaufrere. Ocular gene therapy:Quo vadis?. IOVS 2000;41(10):2821-2826.
26. H. Miyoshi, M. Takahashi, F.H. Gage, I.M. Verma. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. Medical Sciences 1997;94:10319-10323.
27. Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK, Joo CK. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor.Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 22;284(4):966-71.
28.Lim JM, Kim JA, Lee JH, Joo CK. Downregulated expression of integrin alpha6 by transforming growth factor-beta(1) on lens epithelial cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 1;284(1):33-41.
29.Seomun Y, Kim J, Lee EH, Joo CK. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells.Biochem J. 2001 Aug 15;358(Pt 1):41-8.
30.Hong SB, Lee KW, Handa JT, Joo CK. Effect of advanced glycation end products on lens epithelial cells in vitro.Biochem Biophys Res Commun. 2000 Aug 18;275(1):53-9.
31. Kim HS, Yoon SK, Joo CK. The expression of multiple cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental melanin-protein-induced uveitis. Ophthalmic Res. 2001 Nov-Dec;33(6):329-35.
32. H. Kimura, Y. Ogura. Biodegradable Polymers for ocular drug delivery. Ophthalmologica

2001;215:143-155.
33. C.L. Bourlais, L. Acar, H. Zia, P.A. Sado, T. Needham, R. Leverge. Ophthalmic drug delivery systems-recent advances. Progress in retina and eye research 1998;17(1):33-58.
34. A.W.Lloyd, R.G.A.Faragher, S.P.Denyer. Ocular biomaterials and implants. Biomaterials 2001;22:769-785.
35. K. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy, G. Nuber. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. POLYMER 1995;36:837-842.
36. T. Taguchi, Y. Muraoka, H. Matsuyama, A. Kishida, M. Akashi. Apatite on hydrophilic polymer-grifted poly(ethylene) films using an alternate soaking process. Biomaterials 2001;22:53-58.
37. R. C. Thomson, G. G. Giodarno, J.H colier, S.L Ishaung, A.G Mikos, D. Lahiri-Munir, C.A Garcia. Manufacture and caracterization of poly(alpha-hydroxy ester) thin films as temporary substrates for retinal pigment epithelium cells. Biomaterials 1996;17:321-327.