

배양사람각막내피세포판의 이종이식

Xenotransplantation of Cultured Human Corneal Endothelial Cell Sheets

이윤표¹ · 정태영² · 현준영³ · 신영주¹

Yoon Pyo Lee, MD¹, Tae-Young Chung, MD, PhD², Joon Young Hyon, MD, PhD³, Young Joo Shin, MD, PhD¹

한림대학교 의과대학 강남성심병원 안과학교실¹, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 안과학교실², 분당서울대학교병원 안과³

Department of Ophthalmology, Kangnam Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine², Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Seoul National University Bundang Hospital³, Seongnam, Korea

Purpose: To investigate the possibility of transplantation into rabbits of collagenase-induced cultured human corneal endothelial cell plate-rabbit corneal stromal complexes.

Methods: Human corneal endothelial cells were isolated from residual corneal limbus samples and treated with collagenase to create corneal endothelial cell sheets. Cultured sheets were transplanted into the rabbit stroma after the rabbit corneal endothelial cells and Descemet's membrane were removed. Hematoxylin-and-eosin staining and immunofluorescence staining for collagen VIIIa2 (COL8A2) and zonula occludens-1 (ZO-1) were performed. The cultured human corneal endothelial cell sheet-rabbit corneal stromal complex was transplanted into rabbits. On days 3, 5, and 7, the transplanted corneas were photographed and corneal opacity was measured. One week later, the rabbits were sacrificed. Hematoxylin-and-eosin staining and immunofluorescence staining for COL8A2 were performed.

Results: The cultured cells were immunofluorescently stained for collagen VIIIa1 and ZO-1. Collagenase-treated cultured human corneal endothelial cells formed monolayers on day 7 after transplantation into the rabbit corneal stroma and immunofluorescently stained for COL8A2 and ZO-1. The cultured human corneal endothelial cell sheet-rabbit stroma complex transplanted into rabbits was transparent on days 3 and 5, but corneal opacity developed by day 7. Histologic examination revealed 3,3'-diiodo-4,4'-dimethoxybenzylidene-5,5'-dithiobis(2-naphthylsulfonate) (DIO)-stained corneal endothelium (green) and hard-tissue lymphocytes had infiltrated the cultured corneal endothelial cell plate-rabbit corneal stromal complex graft group.

Conclusions: The cultured corneal endothelial cell sheet-rabbit corneal stromal complex prepared with the aid of collagenase showed a potential method for corneal endothelial cell transplantation.

J Korean Ophthalmol Soc 2018;59(6):497-504

Keywords: Collagenase, Corneal endothelial cell, Corneal transplantation, Cultured human corneal endothelial cell sheet, Endothelial cell transplantation

■ Received: 2018. 2. 22. ■ Revised: 2018. 4. 16.

■ Accepted: 2018. 6. 4.

■ Address reprint requests to **Young Joo Shin, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Hallym University Kangnam
Sacred Heart Hospital, #1 Singil-ro, Yeongdeungpo-gu, Seoul
07441, Korea
Tel: 82-2-829-5196, Fax: 82-2-848-4638
E-mail: schinn@daum.net

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

각막내피세포는 각막의 수분을 일정하게 유지하여 각막의 투명성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다.^{1,2} 폭스 각막내피세포 이영양증³ 등의 유전성 질환이나 백내장수술^{4,5} 등이나 외상으로 인해 각막내피세포가 손상을 받아 각막내피세포 부전에 빠지면 각막부종이 생겨서 각막의 본래 기능인 투명성이 손상되어 시력이 소실된다. 이러한 각막내피세포는 나이가 들면서 그 수가 감소하며 인체 내에서는 증식하지 않는 것으로 알려져 있다.⁶ 따라서 각막내피부전의

치료로는 다른 사람의 각막을 이식하는 방법이 최선의, 그리고 유일한 방법이었다.

각막이식은 거부반응이 타 장기에 비해 적은 것으로 알려져 있지만, 이 역시 각막내피세포와 상피세포에 대한 거부반응을 포함하여 이식된 각막에 부전이 오면 재이식이 필요하다.⁷ 또한 각막이식을 시행한 후에 발생하는 봉합사의 발사 문제와 난시의 교정으로 인해 1년까지도 시력 재활이 어려운 경우도 있다.⁸ 따라서 최근 들어 각막내피세포 부전 환자들에서는 각막 후면의 실질을 포함하는 각막내피세포 부분을 이식하는 수술이 각광을 받고 있고 임상에서 많이 시행되고 있다.^{9,11} 그러나 이 수술도 각막 실질의 접합 부에 혼탁이 생기고 거부반응의 문제는 해결되지 않는다. 특히 우리나라는 미국 등의 선진국과는 달라서 각막이식의 공여가 많지 않으므로 수입각막에 의존하여 각막이식이 시행되고 있다.

각막이식 후 남은 공여 각막에서 각막내피세포 부분만을 배양하는 방법은 최근에 확립된 방법이다.^{12,13} 배양된 각막내피세포를 각막에 이식하는 것은 각막상피윤부세포를 이식하는 것보다 더 어렵다. 각막상피는 안표면에 위치하므로 접근이 용이한 반면, 각막내피세포는 방수로 가득 찬 전방내로 좁은 삽입 부위를 통해 주입되어야 하고 제자리에 고정시키는 데 공기 주입이 필요하기 때문이다.^{10,11,14} 이에 연구자들은 배양된 각막내피세포 이식을 위하여 전층 trephination 후 이 각막 버튼 위에 배양된 각막내피세포를 이식하는 것을 동물 모델에서 시도해 왔다.^{14,16} 그러나 이는 기존의 전층각막이식에서 보이는 문제점들인 각막 난시, 봉합부위의 취약성 등의 문제가 해결되지 않는다.¹⁷ 각막내피세포를 배양하여 이를 이식할 수 있으면 공여자가 모자라 수술을 기다릴 필요도 없고 가능한 거부반응도 회피할 수 있는 좋은 방법이 될 것이다. 전층각막이식보다는 부분층각막이식이 거부반응이 적고 그중에서도 데스메막-내피세포이식이 가장 거부반응이 적어 이식되는 조직의 양이 적을수록 거부반응이 적을 것을 시사해왔다.^{18,19} 만약 세포만 이식할 수 있다면 가장 거부반응이 적은 방법이 될 것이다. 이에 본 연구에서는 배양사람각막내피세포의 형질 표현을 관찰하고자 하였으며, collagenase를 이용하여 만든 배양사람각막내피세포판이 가토의 각막실질에 적절히 유착하는지, 그리고 이렇게 만들어진 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체의 생체이식이 가능한지 실험해 보고자 하였다.

대상과 방법

사람각막내피세포 배양

사람각막내피세포 배양 및 사용은 한림대학교 강남성심

병원 임상시험심사위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 받았다. 임상에서 각막이식수술 후 남은 각막 공여편을 사용하여 수술용 현미경 밑에서 내피세포가 붙은 데스메막을 분리해냈다. 분리한 내피세포와 데스메막은 Ca²⁺과 Mg²⁺가 포함되지 않은 phosphate buffer solution로 세척한 후 ethylenediaminetetraacetic acid를 사용하여 1시간 동안 처리하고 0.25% trypsin을 5분간 처리하여 내피세포와 데스메막을 분리하고 내피세포를 각각 한 개의 세포로 분리한다. 분리된 세포를 1,500 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 제거하고 세포 pellet에 배양액을 넣어 부유시킨 후 배양용기에 넣어 배양하였다. 배양액으로는 Opti-Mem I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 기본으로 하여 fetal bovine serum (8%), calcium chloride, chondroitin sulfate, ascorbic acid, pituitary extract, epidermal growth factor, nerve growth factor, gentamicin, penicillin, streptomycin을 첨가하였다. 4차 계대배양을 거친 각막내피세포가 사용되었다.

면역세포화학염색

사람각막내피세포를 커버글라스 위에서 배양한 후 3.3% paraformaldehyde 용액으로 20분간 고정하였다. 세포들은 0.1% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 10분간 permeabilization하였고 1% horse serum으로 1시간 동안 incubation한 후 일차 항체 rabbit anti-collagen VIIIa1, rabbit anti-ZO에 4°C에서 밤새 반응시킨 후 이차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody로 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Hoechst 33342로 핵을 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

Collagenase를 이용한 배양사람각막내피세포판 제조

완전히 confluent하게 배양한 사람각막내피세포에 collagenase A (2 mg/mL)를 사용하여 2-6시간 37°C에서 incubation을 시행하였다.

배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체의 제조

가토각막실질은 전신마취하에서 7.75 mm의 trephine으로 가토의 각막을 얻은 후 각막상피 부분과 각막내피 부분을 절제하여 제거하고 각막실질만 층판 형태로 절제하여 얻었다. Collagenase를 처리하여 만든 배양사람각막내피세포판을 가토각막실질 위에 놓고 1,200 g에서 5분간 원심분리를 시행하여 세포와 실질 사이의 부착을 강화한다. 세포는 미리 3,3'-diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate (DIO; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 염색하여 cell tracking을

하였다. 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 동결절편을 시행한 후 Hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였고, COL8A2와 ZO-1에 대해 면역형광염색을 시행하였다. 면역조직화학염색은 다음과 같이 시행하였다. 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 optimal-cutting-temperature compound에 넣어 5 µm 두께로 냉동절삭을 시행 후 0.3% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham)으로 10분간 반응시켰고, 1% horse serum으로 1시간 배양한 후 일차 항체 rabbit anti-COL8A2, rabbit anti-ZO-1에서 40°C에서 밤새 반응시킨 후 이차 항체인 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody로 37°C에서 1시간 반응시켰다. Hoechst 33342로 핵을 염색을 한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체의 생체 이식

동물 실험은 분당서울대학교병원 동물실험윤리위원회 (institutional animal care and use committee)의 승인을 받았다. 생체실험으로 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 가토에서 이식하였다. 가토를 전신마취를 시행한

후 전방 내에 viscoelastic device를 주입한 후 각막을 7.5 mm trephine으로 제거하고 10-0 nylon으로 그 자리에 지름 7.75 mm의 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 이식하였다. 대조군으로는 배양사람각막내피세포판을 포함하지 않은 가토각막실질을 사용하였다. 각 군은 5마리였으며 총 10마리가 사용되었다. 이식한 날부터 하루에 한번 맥시트롤 안연고(Maxitrol[®] ointment, Novartis, Basel, Switzerland)를 점안해주었다. 3일, 5일, 7일째에 이식한 각막을 사진촬영하고 각막흔탁을 측정한 후 1주일 뒤에 가토를 희생하고 조직검사를 시행하여 H&E 염색과 COL8A2에 대한 면역형광염색을 시행하였다. 각막흔탁은 Grade 0은 전체가 투명한 것, Grade 1은 흔탁은 있으나 보기 힘든 것, Grade 2는 쉽게 흔탁이 발견되나 홍채의 세부가 보이는 것, Grade 3는 홍채의 세부가 보이지 않는 것, Grade 4는 완전히 흔탁한 경우로 등급화하였다.

결 과

사람각막내피세포의 배양 및 면역형광염색

배양된 세포들은 각막내피세포의 표지자로 쓰이는 colla-

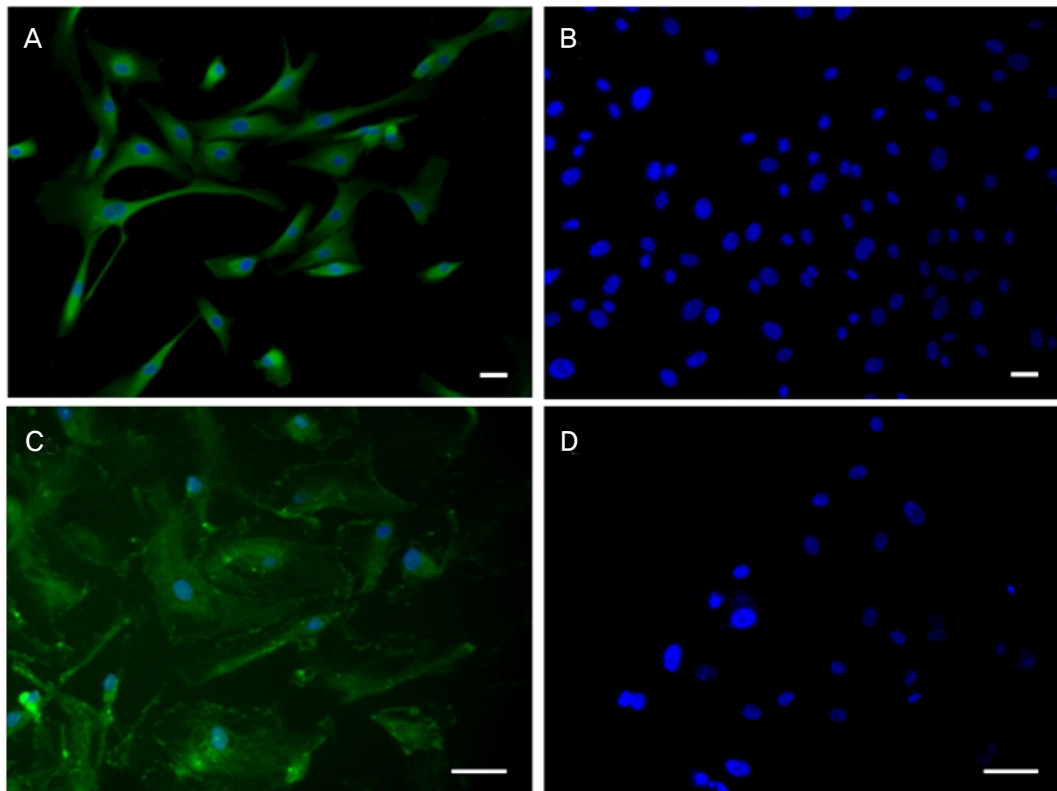


Figure 1. Human corneal endothelial cell (HCEC) culture and immunofluorescence staining. Cultured HCECs expressed collagen VIIIa2 (green) which is a marker of corneal endothelial cells (A), and ZO-1 (green) which is an indicator of tight junction (C). Negative staining was performed with the omission of a primary antibody (B, D). Scale bar = 50 µm.

gen VIIIa2에 대해 형광염색을 보였다(Fig. 1A). ZO-1 염색은 세포간 tight junction의 형성 여부를 보는 데 사용되는데, 세포 주변부의 밝은 녹색 점들이 ZO-1에 면역형광염색된 것이고, 이 ZO-1은 세포에 전체적으로 조금씩 퍼져 보였다(Fig. 1C). 일차 항체에 반응시키지 않은 경우에는 형광염색되지 않았다(Fig. 1B, D).

Collagenase를 이용한 배양사람각막내피세포판의 탈착 및 재부착

Collagenase를 이용한 배양사람각막내피세포판은 세포배양기의 바닥에서 탈착되었고 세포 용기 배양액 안에 판상을 유지하며 떠다니는 형태를 보였다(Fig. 2A). 탈착된 배양사람각막내피세포판에 원심분리를 시행하여 상층액에 포함된 collagenase를 제거시킨 후, fibronectin and collagen-coating된 바닥에 다시 부착시켰다(Fig. 2B). 재부착된 배양사람각막내피세포판은 ZO-1에 대해 면역염색되었다(Fig. 2C).

배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체의 제조

원심분리를 통해 제조된 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체는 DIO로 염색된 세포가 단층으로 각막실질 위에 부착되었다(Fig. 3A). H&E 염색에서는 각막실질 위에 단층의 배양사람각막내피세포가 관찰되었다(Fig. 3B). 이식된 배양사람각막내피세포판은 COL8A2와 ZO-1을 각막실질 위에서 표현하였다(Fig. 3C, D).

배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체의 생체 이식

생체실험에서 가토에 이식한 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체는 3일째와 5일째에 유의하게 각막혼탁

이 적고 투명하였으나($p=0.008$ in all, independent t -test) 7일째에는 각막혼탁이 발생하였다($p=0.057$; Fig. 4). 조직 검사에서 DIO-stained cells (green)로 염색된 각막내피가 관찰되었으며(Fig. 5), H&E 염색에서 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체 이식군에서 경도의 림프구가 침착되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 6A). Collagen type VIII alpha 2에 대한 면역형광염색에서 Collagen type VIII alpha 2를 표현하는 세포가 각막내피에서 관찰되었다(Fig. 6B).

고 찰

사람의 각막내피세포는 인체 내에서 증식하지 않는 것으로 오랫동안 알려져 왔으나, *in vitro* 실험에서 여러 가지 성장인자들을 넣어주면 실험실에서 증식시킬 수 있는 것으로 확립되었다.^{12,15} 이에 따라 각막실질과 각막상피는 정상이나 각막내피세포만 손상되어 각막내피세포 부전에 빠진 경우 배양사람각막내피세포를 이식하려는 시도가 진행되고 있다.^{14,15,20} 본 연구는 이에 각막내피세포를 배양하여 이식하는 방법이 가능한지에 대한 타당성을 검토하기 위하여 시도되었다.

Collagen VIIIa는 각막내피세포에서 분비된다.^{21,22} 이는 collagen VIII alpha 2의 homodimer 혹은 collagen VIII alpha 1과 alpha 2의 heterodimer로 구성된 각막내피세포의 바닥막인 데스메막의 주요한 성분이다. 각막내피세포 질환으로 유명한 폭스 각막내피세포 이영양증은 collagen VIII alpha에 이상이 있는 것으로 알려져 있다.²²

세포 간의 접합과 교통은 조직의 형성과 기능의 발현에 중요하다. 각막내피세포는 각막상피세포보다 세포 간 접합이 느슨하여 세포 간 간극으로 이온들과 분자들이 각막간질로 들어가는 통로가 된다. ZO-1에 대한 면역형광염색은

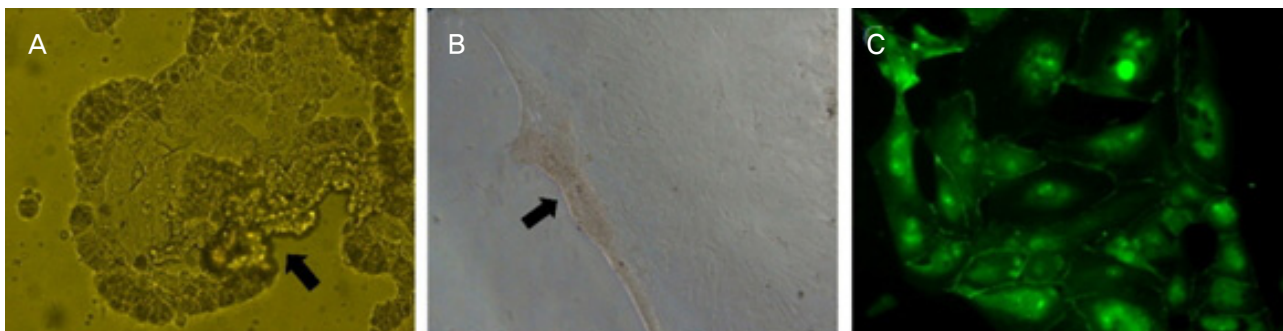


Figure 2. Detachment and reattachment of cultured human corneal endothelial cell sheets. (A) Cultured human corneal endothelial cell sheets using collagenase were detached from the bottom of the cell dishes and floating in the media (black arrow). (B) Cultured human corneal endothelial cell sheets using collagenase were reattached onto the fibronectin and collagen-coated slides (black arrow). (C) Cultured human corneal endothelial cell sheets using collagenase were immune-stained with ZO-1 (green) after reattachments.

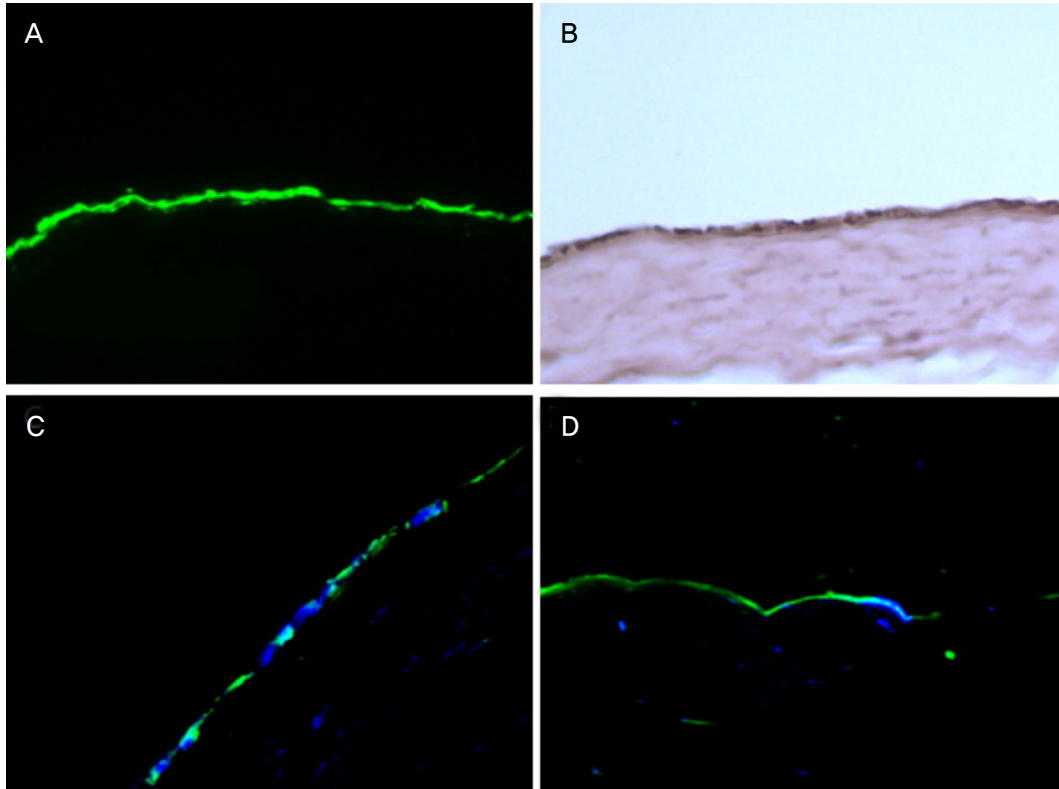


Figure 3. Histology of 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DIO), hematoxylin and eosin staining and immunofluorescent staining of COL8A2 and ZO-1 of cultured human corneal endothelial cell sheets-rabbit corneal stroma complex. (A) DIO-stained cells (green) were identified on the corneal stroma. (B) Hematoxylin and eosin staining showed the mono-layer human corneal endothelial cells on the corneal stroma. (C, D) Transplanted human corneal endothelial cell sheets expressed COL8A2 (C; green) and ZO-1 (D; green) on the corneal stroma. Magnification $\times 200$.

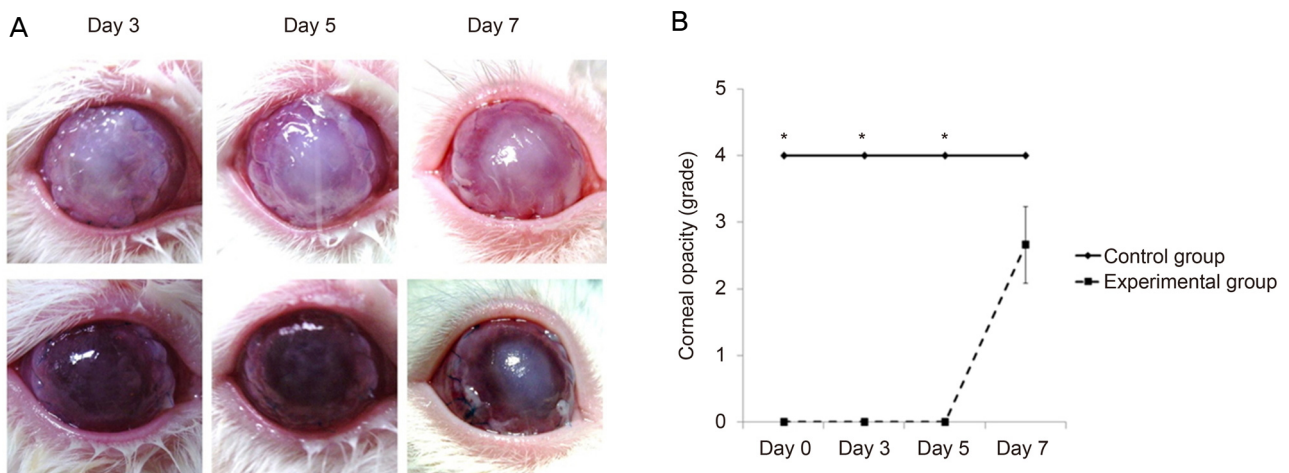


Figure 4. Representative pictures of *in vivo* transplantation of cultured human corneal endothelial cell sheets-rabbit corneal stroma complex (A) and corneal opacity grade (B). (A) Cultured human corneal endothelial cell sheets-rabbit corneal stroma complex (3 photos above) showed more transparent compared with control (3 photos below). (B) Corneal opacity grade in the experimental group was lower compared to the control group at day 1, 3 and 5. At day 7, cornea in the experimental group became more opaque than baseline. *Statistically significant by independent *t*-test.

tight junction의 위치를 보여주고 connexin 43은 gap junction의 위치를 보여준다.²³ Chen et al²⁴은 각막내피세포와

각막섬유모세포의 이식을 보고하면서 성장인자의 제거가 정상세포 간의 접촉을 형성하는 데 중요하다고 보고하였다.

본 연구에서는 각막내피세포의 배양 후 4번 계대배양한 세포들에서 세포들 간 tight junction의 형성과 gap junction의 형성을 보였다.

또한 본 연구는 이식 7일째에 가토를 희생하여 H&E 염색을 시행하였다. Fig. 6A에서 검은 화살표로 표시된 부분이 림프구인데, 관찰되는 림프구의 수가 너무 적어 이것이 이식 거부반응을 의미하는 것인지 이식 실패를 의미하는 것인지 명확하게 구별하는 데에는 어려움이 있었다. 또한 배양사람각막내피세포판을 지지해주는 carrier가 없었기 때문에 이로 인해 내피세포가 떨어져 나간 것일 가능성도 있다.

본 연구와 유사하게 배양각막내피세포의 이식을 시도해 본 몇몇 연구들이 있다. Koizumi et al²⁵은 원숭이의 배양각막내피세포를 원숭이 눈의 전방에 주입하여 동종간 이식을 시도하였다. 원숭이의 각막내피세포를 채취 후 배양하였고, 이렇게 배양된 배양각막내피세포판을 collagen type 1 car-

rier에서 4주간 배양하였다. 이를 원숭이 눈의 전방에 주입 후 공기를 주입하여 이식하였고, 그 결과 수술 후 6개월까지도 각막이 투명하게 유지되었다고 보고하였다. Mimura et al²⁶은 사람에서 배양한 배양각막내피세포를 토끼 눈의 전방에 주입하여 이종간 이식을 시도하였다. 마찬가지로 collagen type 1을 carrier로 이용하여 배양사람각막내피세포판을 토끼 눈의 전방에 주입하여 이식하였다. 그 결과 수술 후 28일째까지 관찰하였는데 대조군에 비해 유의하게 각막이 투명하게 유지되었다고 보고하였다.

본 연구는 Mimura et al²⁶이 보고한 경우와 비슷하게 사람에서 토끼로의 이종간 이식을 시도하였다. 위 연구와의 차이점은 데스메막 역할을 해주는 collagen type 1과 같은 carrier를 사용하지 않고 원심분리만을 이용하여 배양사람각막내피세포판을 가토각막실질에 부착시켰다는 점이다. 또한 이러한 방법으로 인해 불가피하게 이식 받는 가토의 각막을 trephination한 후 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 전층각막이식 형태로 이식했다는 점이다. 다른 여러 논문에서도 배양각막내피세포판의 carrier로서 collagen뿐만 아니라 수정체낭, 양막, 그리고 기타 생물학적 제제들을 소개한 바 있다.²⁷⁻²⁹ 하지만 이러한 carrier 또한 결국엔 이식 받는 눈에게 이물로 작용하게 되어 수술 후 거부반응을 유발할 확률을 높일 수 밖에 없다. 이에 본 저자들은 carrier 없이 배양사람각막내피세포판만을 이식하였을 경우 이것이 각막내피세포로서의 기능을 할 수 있는지 알아보려고 하였다. 물론 타 논문들에 비해 이식 후 각막의 투명성이 유지되는 기간은 훨씬 짧았다. 그 이유는 전층각막이식 방법 자체가 거부반응을 더욱 잘 일으킬 뿐만 아니라, carrier 없이 원심분리만을 이용한 배양각막내피세포판과 가토각막실질의 부착력이 상대적으로 약해서 거부반응을 더 일으켰을 것이라고 생각한다. 이를 극복하기 위해서는 배양각막내피세포판을 전방 내로 주입하여 carrier 없이

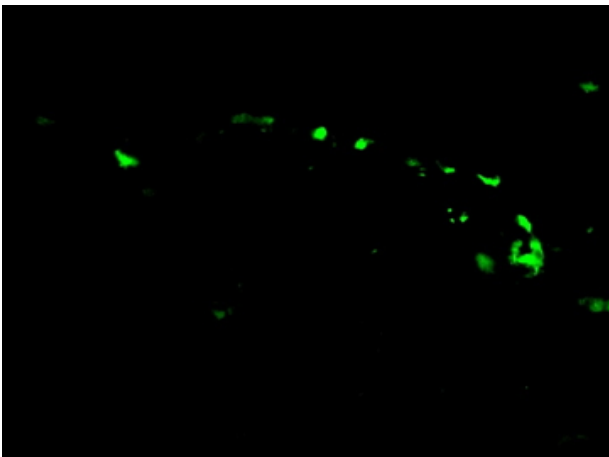


Figure 5. Histology showed 3,3'-diiodo-4,4'-dimethoxybenzidine (DIO)-stained cells (green) on the corneal endothelium at day 7. Magnification $\times 200$.

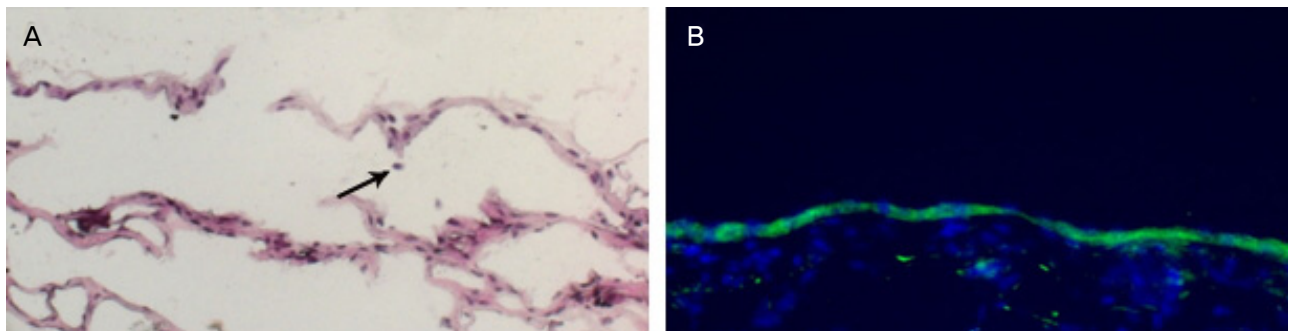


Figure 6. Hematoxylin and eosin staining (A), and immune fluorescence staining with collagen type VIII alpha 2 (B) at day 7. (A) Transplanted human corneal endothelial cells were on the inner surface of cornea. A few inflammatory cells were shown (black arrow), which indicates the graft rejection or graft primary failure. (B) Collagen type VIII alpha 2-expressing cells were on the inner surface of cornea. Magnification $\times 200$.

강력하게 부착시킬 수 있는 방법을 지속적인 연구를 통해 찾아내야 할 것이다. 그렇지만 본 연구는 carrier 없이 배양 사람각막내피세포판만을 생체 내로 이식하였을 경우, 그 생존기간은 7일 이내로 짧았지만 생존기간 동안에는 이식된 배양사람각막내피세포판이 분명히 각막내피세포로서의 기능을 보였다는 것에 큰 의의가 있다.

본 연구에서 가토에게 배양사람각막내피세포판-가토각막 실질 복합체를 생체이식한 결과 이식 7일째에 각막혼탁이 발생하긴 하였지만, 혼탁 발생 이전에 배양사람각막내피세포가 확실히 기능을 하는 것을 확인하였고, 이를 통해 생체 이식의 가능성은 충분히 보여주었다. 이러한 연구들을 통한 최종적인 목표는 collagenase를 이용하여 만든 배양사람 각막내피세포판을 각막내피세포 부전 환자들에게 전방 내로 직접 이식하는 것이다. 이 방법으로 이식을 하게 되면 수술 시 환자들의 데스메막을 벗겨낼 필요 없이 배양사람 각막내피세포판만 이식한 후 전방 내에 공기를 주입해주면 된다. 배양사람각막내피세포판 이식의 장점은 공여자를 기다리지 않고 바로 수술을 진행할 수 있다는 점과 부분층각막이식이기 때문에 전층각막이식보다 거부반응이 적고 수술 후 봉합사로 인한 문제점이 발생하지 않는다는 점이다. 향후 추가적인 연구를 통해 배양사람각막내피세포판을 인체에 직접 생체이식할 수 있는지에 대한 철저한 검토가 필요할 것이다.

REFERENCES

- Geroski DH, Edelhauser HF. Quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1056-60.
- Dikstein S. Efficiency and survival of the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 1973;15:639-44.
- Bourne WM, Johnson DH, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. III. Fuchs' dystrophy. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1952-5.
- Polack FM, Sugar A. The phacoemulsification procedure. III. Corneal complications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:39-46.
- Naumann GO. Corneal endothelial decompensation following intraocular surgery. *Ophthalmology* 1985;92:714.
- Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2152-9.
- Bertelmann E, Pleyer U, Rieck P. Risk factors for endothelial cell loss post-keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:766-70.
- Olson RJ, Pingree M, Ridges R, et al. Penetrating keratoplasty for keratoconus: a long-term review of results and complications. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:987-91.
- Melles GR, Ong TS, Ververs B, van der Wees J. Preliminary clinical results of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008;145:222-7.
- Leyland M. Syringe or pump for air-assisted DSAEK. *J Cataract Refract Surg* 2009;35:2; author reply 2.
- Terry MA, Shamie N, Chen ES, et al. Precut tissue for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: vision, astigmatism, and endothelial survival. *Ophthalmology* 2009;116:248-56.
- Park CY, Zhu Z, Zhang C, et al. Cellular redox state predicts in vitro corneal endothelial cell proliferation capacity. *Exp Eye Res* 2006;83:903-10.
- Li W, Sabater AL, Chen YT, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:614-20.
- Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial deficiency model. *Curr Eye Res* 2007;32:617-23.
- Lai JY, Chen KH, Hsiue GH. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation* 2007;84:1222-32.
- Patel SV, Bachman LA, Hann CR, et al. Human corneal endothelial cell transplantation in a human ex vivo model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2123-31.
- Ple-Plakon PA, Shtein RM. Trends in corneal transplantation: indications and techniques. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25:300-5.
- Li S, Liu L, Wang W, et al. Efficacy and safety of Descemet's membrane endothelial keratoplasty versus Descemet's stripping endothelial keratoplasty: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0182275.
- Jhanji V, Mehta JS, Sharma N, et al. Targeted corneal transplantation. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23:324-9.
- Yoshida J, Yokoo S, Oshikata-Miyazaki A, et al. Transplantation of human corneal endothelial cells cultured on bio-engineered collagen vitrigel in a rabbit model of corneal endothelial dysfunction. *Curr Eye Res* 2017;42:1420-5.
- Kobayashi A, Fujiki K, Murakami A, et al. Analysis of COL8A2 gene mutation in Japanese patients with Fuchs' endothelial dystrophy and posterior polymorphous dystrophy. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:195-8.
- Kuot A, Mills R, Craig JE, et al. Screening of the COL8A2 gene in an Australian family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Clin Exp Ophthalmol* 2014;42:198-200.
- Chen J, Li Z, Zhang L, et al. Descemet's membrane supports corneal endothelial cell regeneration in rabbits. *Sci Rep* 2017;7:6983.
- Chen KH, Hsu WM, Lee SM. Differential effects of transforming growth factor-beta2 on corneal endothelial cell proliferation-A role of serum factors. *Exp Eye Res* 2002;75:61-7.
- Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4519-26.
- Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2992-7.
- Van den Bogerd B, Ni Dhubbghaill S, Zakaria N. Characterizing human decellularized crystalline lens capsules as a scaffold for corneal endothelial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12:e2020-8.
- Kimoto M, Shima N, Yamaguchi M, et al. Development of a bio-engineered corneal endothelial cell sheet to fit the corneal curvature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2337-43.
- Teichmann J, Valtink M, Gramm S, et al. Human corneal endothe-

lial cell sheets for transplantation: thermo-responsive cell culture carriers to meet cell-specific requirements. Acta Biomater

2013;9:5031-9.

= 국문초록 =

배양사람각막내피세포판의 이종이식

목적: Collagenase를 이용한 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 만들어 가토에서 이식의 가능성을 알아보고자 하였다. **대상과 방법:** 각막이식을 하고 남은 윤부 각막에서 사람각막내피세포를 분리 배양하여 collagenase를 사용하여 사람각막내피세포판 (sheets)을 만들었다. 가토의 각막을 얻어 가토각막내피세포와 데스메막을 제거한 실질에 사람각막내피세포판을 이식하여 배양사람 각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 만들었다. 조직검사로 Hematoxylin and eosin 염색 및 collagen VIIIa2 (COL8A2), zonula occludens-1 (ZO-1)에 대해 면역형광염색을 시행하였다. 가토에서 각막을 trephine으로 제거하고 그 자리에 생체실험으로 배양사람 각막내피세포판-가토각막실질 복합체를 이식하였다. 3일, 5일, 7일째에 이식한 각막을 사진 촬영하고 각막혼탁을 측정한 후 1주일 후에 가토를 희생하고 조직검사를 시행하여 Hematoxylin and eosin 염색과 COL8A2에 대한 면역형광염색을 시행하였다.

결과: 배양된 세포들은 collagen VIIIa1, ZO-1에 면역형광염색이 되었다. Collagenase로 만든 배양사람각막내피세포판은 가토각막실질에 이식 후 배양 7일째 조직 검사에서 단층으로 자랐고 COL8A2와 ZO-1에 면역형광염색이 되었다. 생체실험에서 가토에 이식한 배양 사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체는 3일째와 5일째에 유의하게 각막혼탁이 적고 투명하였으나 7일째에는 각막혼탁이 발생하였다. 조직 검사에서 3,3'-diiodoacarbocyanine perchlorate (DIO)-stained cells (green)로 염색된 각막내피가 관찰되었으며 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체 이식군에서 경도의 림프구가 침착되어 있는 것이 관찰되었다.

결론: Collagenase를 이용한 배양사람각막내피세포판-가토각막실질 복합체는 각막내피세포 이식의 방법으로서 충분한 가능성을 보였다.

〈대한안과학회지 2018;59(6):497-504〉
