

조직공학을 이용한 각막상피 세포를 접종한 생인공간질층 제조

안재일¹, 장인근^{1,2}, 김재찬², 송계용³, 이희구⁴, 윤도영⁴, 부하령⁴, 김기호⁵, 박정극¹
동국대학교 화학공학과¹, 중앙대학교 부속용산병원 안과², 중앙대학교 의과대학 병리학교실³,
생명공학연구원 세포생물학연구실⁴,(주)바이오랜드 생명공학연구소⁵
전화(02) 2260-3365, FAX (02) 2271-3489

Abstract

The corneal tissue consists of three layers : epithelium, stroma, and endothelium. Central cornea is a highly differentiated tissue whereas the limbus contains the epithelial stem cell. In the present study, we report the engineering of the three-dimensional reconstructed cornea derived from rabbit limbal epithelial and stromal cells. The differentiation degree of corneal stem cells were assessed in serum concentration and inoculation density of stromal cells. Optimal condition differentiation of corneal stem cells is achieved when 5% FBS was supplemented to culture medium and $1-2 \times 10^5$ cells/ml inoculation density of stromal cells.

서론

시력유지에는 건강한 안구표면이 중요하며 안구표면은 각막과 결막으로 이루어져 있다. 각막은 두께가 0.5mm로서 5-7층의 상피세포층, 두께의 90%를 차지하는 간질과 간질세포(keratocyte) 및 내피세포로 구성되어 있다. 그 중 각막상피세포의 유지는 시력과 밀접한 관계가 있고, 상피세포의 분화와 증식에 필수적인 간세포(stem cell)는 윤부(limbus)라고 하는 부위에 존재한다. 윤부는 장벽(barrier)역할을 하며 각막조직에 혈관이 없는 특성을 유지하게 한다. 윤부의 손상은 바닥막의 파괴, 간질의 만성염증, 지속성 상피결손과 신생혈관이 자라 들어와 결국은 실명을 초래하게 되는데 이러한 윤부손상 환자들은 한국에서도 약 10만명 정도가 있을 것으로 추정된다. 치료는 일단 윤부이식 (limbal transplantation)을 시행하여 각막의 혈관생성이 억제되고 안정화되면 각막이식수술(penetrating keratoplasty)을 받게 된다. 한국에서는 각막이식을 받기 위한 대기자가 약 5 만명정도로 추산되고 있으나 각막의 공여자는 많지 않은 실정이어서 생인공 각막을 개발하는 일은 대단히 중요한 일이다.

본 연구에서는 질병이나 사고로 잃어버린 신체의 일부나 장기 또는 조직을 다시 재생시켜 복구하는 치료방법인 조직공학(Tissue Engineering)을 이용하여 각막의 부분층을 제조하고자 하였다. 각막 섬유아세포를 콜라젠 젤에 배양한 다음 각막 상피 간세포를 접종 배양하여 부분층 제조에 사용하였다. 배지의 혈청농도, 간질 세포

의 접종 농도를 달리하여 상피 간세포의 분화를 최적화 하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 각막 세포의 일차배양

Explantation 방법을 이용하여 각막 세포를 일차배양하였다. 우선 안구에서 각막편을 분리한 다음 2-3mm 크기로 biopsy 하였다. 각막 간질층을 두층으로 나누어 각막 간질 세포는 간질층 쪽을 배양용기에 부착시키고, 각막 상피 간세포는 상피 세포쪽을 배양용기 쪽으로 하여 부착시켰다. 부착된 조직으로부터 세포가 자라나오도록 하였다. 본 실험에서는 3세대 세포를 사용하였다. 각막 간질 세포는 DMEM을 사용하였고 각막 상피 간세포의 배지는 Epilife(with human corneal growth supplement)를 사용하였다.

2) 각막 간질층의 부분층 제조

0.3% collagen과 각막 간질 세포를 이용하여 각막 간질층을 대신하였다. 각막 간질 세포를 1×10^5 cells/ml의 농도로 collagen solution과 섞어 간질층을 제조하였으며 배지는 DMEM/10% FBS를 사용하여 배양하였다. 각막 간질세포를 3일간 배양한 후 각막 상피 간세포를 4×10^5 cells/ml 농도로 간질층 위에 접종하였다. 각막 상피 간세포가 접종된 각막 부분층을 DMEM/10% FBS와 supplement가 첨가된 Epilife 배양배지를 1:1로 하여 3일간 submerged 배양하였다. 3일간의 배양 후 10일간 air-liquid interface로 DMEM/10% FBS와 supplement가 첨가되지 않은 Epilife 배양배지를 1:1로 하여 3일간 배양하였다. HE-staining 방법으로 세포의 분화 정도를 관찰하였다.

3) 혈청 및 간질 세포수가 각막 상피 간세포의 분화에 미치는 영향

(1) 혈청이 각막 상피 간세포의 분화에 미치는 영향

2)번의 각막 부분층의 3일간의 submerged 배양 후 air-liquid interface 배양시 혈청농도를 다양하게 하여 각막 상피 간세포의 분화 정도를 관찰하였다.

(2) 간질 세포수가 각막 상피 간세포의 분화에 미치는 영향

2)번의 collagen 용액과 각막 간질 세포를 이용한 각막 간질층의 제조에서 각막 간질 세포 수를 달리하여 각막 상피 간세포의 분화 정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1) 각막 세포의 일차배양

Figure 1과 2는 각각 각막 간질 세포와 각막 상피 간세포의 일차 배양에서 얻어진 세포의 광학현미경 사진이다. Figure 1의 왼쪽 상단은 조직이 있는 방향으로

2-3층의 세포층이 관찰되며 세포가 계속적으로 조직에서 나오는 형태를 보이고 있다. Figure 2는 각막 상피 간세포의 일차 배양에서 얻어진 세포로 어두운 부분은 공막부분, 밝은 부분은 각막 부분으로 각막과 공막의 경계인 윤부에서 각막 상피 간세포가 배양되었음을 알 수 있다.

2) 혈청 및 간질 세포수가 각막 상피 세포의 분화에 미치는 영향

Figure 3, 4는 각각 각막 부분층의 air-liquid interface 배양시 2.5%, 5% FBS로 배양하였을 때의 각막 부분층의 HE staining 사진을 보여준다. Figure 3은 1-3층의 각막 상피 간세포가 분화된 모습을 보여주고 있고 Figure 4는 여러 층으로 분화된 각막 상피 간세포의 모습을 보여준다.

Figure 5, 6은 각각 각막 간질층의 제조시 각막 간질 세포가 없는 것과 각막 간질 세포를 5×10^4 cells로 하여 제조한 각막 부분층의 분화된 모습을 보여준다. Figure 5는 상피 세포가 간질층 위로 뭉친 것을 관찰 할 수 있고 Figure 6에서는 각막 상피 간세포가 잘 분화된 모습을 볼 수 있다.

요약

각막 상피 간세포의 분화는 배지의 혈청농도를 5% FBS, 간질세포의 접종농도를 $1-2 \times 10^5$ cells/ml의 농도로 하는 것이 최적의 결과를 얻을 수 있었다. 제조한 생인공 각막의 부분층은 독성용 인공각막으로도 사용될 수 있을 것으로 생각되며 이식용 생인공 각막의 기초 자료로 사용될 수 있다. 이후의 연구는 제조한 생인공 각막의 부분층에 각막 내피 세포를 배양하여 전층 생인공 각막을 제조하는 것이다.

참고문헌

1. Akira K., "Differentiation in cultured limbal epithelium as difined by keratin expression(1991)", Invest Oph Vis Sci, 32(12), 3073-3077
2. Hillary A., "Primary culture of normal rat mammary epithelial cells within a basement membrane matrix. I. regulation of proliferation by hormones and growth factors"(1990), In vitro Cell Dev Biol, 26, 791-802
3. James D., "Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells : Importance of culture enviroment and endothelial cell interaction"(1994), Exp Cell Res, 214, 621-633
4. Kristina L., "In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation"(1993), Invest Oph Vis Sci, 34(9), 2672-2679
5. Lucie G., "Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering"(1999), Pathobiology, 67, 140-147

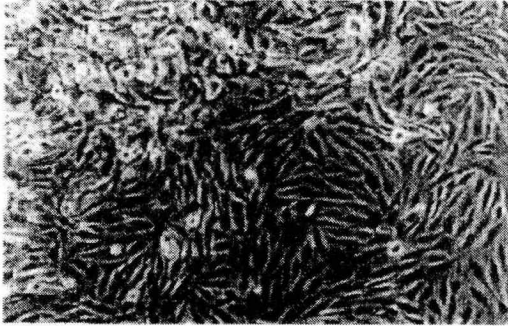


Figure 1. Primary cell of rabbit corneal fibroblast

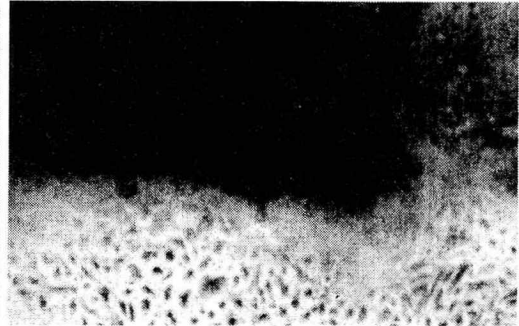


Fig 2. Primary cell of rabbit corneal limbal epithelial cell



Figure 3. Manufacture of partial artificial cornea (with 2.5% FBS)

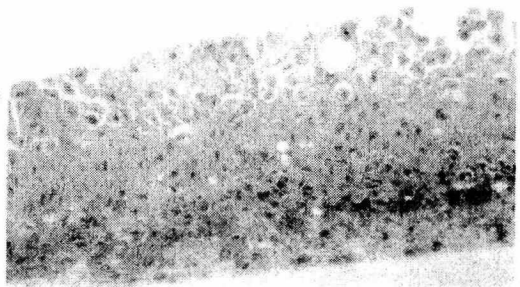


Figure 4. Manufacture of partial artificial cornea (with 5% FBS)

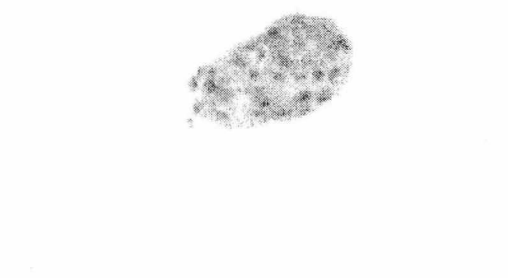


Figure 5. Manufacture of partial artificial cornea (without stroma cell)



Figure 6. Manufacture of partial artificial cornea (with 1×10^5 cells/ml stroma cells)