



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0041882  
(43) 공개일자 2018년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 48/00 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0134191  
(22) 출원일자 2016년10월17일  
심사청구일자 2016년10월17일

(71) 출원인  
한림대학교 산학협력단  
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)  
사회복지법인 삼성생명공익재단  
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)  
서울대학교병원  
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)  
(72) 발명자  
신영주  
서울특별시 강남구 선릉로 130길 20, 래미안삼성  
2차아파트 107동 301호  
정태영  
경기도 성남시 분당구 백현로 265, 602동 1103호  
현준영  
경기도 성남시 분당구 판교원로 207, 501동 403호  
(74) 대리인  
특허법인태동

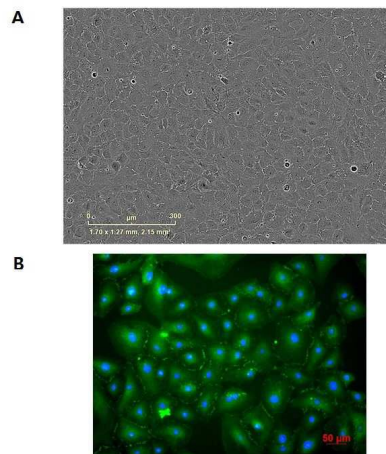
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 TCF4를 포함하는 사람각막내피세포질환 치료제

(57) 요약

본 발명은 TCF4 유전자 또는 단백질을 포함하는 사람각막내피세포질환 치료제에 관한 것으로, 본 발명의 TCF4는 사람각막내피세포에서 미토콘드리아 기능, 에너지 생산, 자가포식, 세포 증식 등의 기능을 조절하는 것으로 확인되었다. TCF4의 사람각막내피세포 내 도입은 각막내피세포의 재생능력을 회복시켜 각막 반흔 또는 각막 혼탁 등의 사람각막내피세포 질환을 치유할 수 있는 것을 의미한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

Y10S 514/912 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A09058505

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 기초연구사업 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 각막내피질환에서 각막내피의 재생

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TCF4 (Transcription factor 4) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제.

#### 청구항 2

TCF4 (Transcription factor 4) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 TCF4 (Transcription factor 4)는,

사람각막내피세포의 미토콘드리아 활성을 조절하는 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 치료제는,

키트 형태인 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 사람각막내피세포질환은,

각막 반흔 질환 또는 각막 혼탁 질환인 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 TCF4를 포함하는 사람각막내피세포질환 치료제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 TCF4 유전자 또는 단백질을 포함하는 사람각막내피세포질환 치료제에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 사람각막내피세포 (human cornea endothelial cell)는 각막의 후면의 데스메막 위에 존재하며, 각막의 탈수를 조절하여 투명성을 유지하는 역할을 한다. 사람각막내피세포는 소듐-포타슘 아데노신 트리포스파타아제 (sodium-potassium adenosine triphosphatase)를 사용하여 각막기질 내 수분을 퍼내는데, 이에 많은 양의 에너지가 소비된다.

[0004] 한편, 사람각막내피세포의 이행대에는 줄기세포가 있다는 보고가 있으나, 생체 내에서는 제한적 증식능을 가져

한번 다치면 재생되지 않는다. 최소한 400~500 cell/mm<sup>2</sup> 의 세포 밀도가 각막내피의 펌프 기능을 유지하는데 필요한데, 이보다 적어지면 심한 안통과 각막맹을 야기하는 물질각막병증이 될 수 있다.

[0005] 폭스각막내피이영양증 (FECD)은 각막내피세포 질환으로 각막맹을 일으키는 원인 중의 하나이다. 각막 구타타가 각막 중심부에 나타나서 점점 융합되고 커지면서 각막내피세포가 손상을 받고 결국에는 각막내피 부전에 빠져 각막이식을 요하는 물질각막병증이 된다. 폭스각막내피이영양증은 *COL8A2*, *SLC4A11*, *TCF4* 등의 유전자와 관련된 것으로 생각되고 있다.

[0006] 이중, TCF4 (Transcription factor 4)는 각막내피세포에서 발현하는데 폭스각막내피이영양증과 관련되어 있다. 'SNP rs613872 risk variant'의 존재는 TCF4의 활성도를 감소시킨다. TCF4는 Wnt 신호체계에서 중요한 역할을 하는데 주요한 효과자일뿐만 아니라 세포 증식과 분화를 조절하는 주 스위치 (master switch) 이다. 또한, TCF4는 줄기세포와 암세포에서도 중요한 역할을 하며 '상피-간엽 전환분화 (epithelial-mesenchymal transdifferentiation)'를 유도하는 것으로 알려져 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제1020130064036 (2013.06.17)에는, 유효성분으로 라이소포스포티드산 및 아데닐일 사이클라아제 억제제를 줄기세포에 처리함으로써, Wnt 신호 경로에 관련된  $\beta$ -카테닌 및 이와 관련된 단백질인 TCF4, 사이클린 D1, c-myc의 발현을 촉진하고, 피부 각질 줄기세포 마커인  $\alpha 6$  인테그린과 모낭 줄기세포 마커인 CD34의 발현을 촉진하여, 줄기세포를 활성화시키는 방법이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제1020160063326호 (공개일자: 2016.06.03)에는, 리포솜 Wnt 폴리펩티드, 예를 들어 리포솜 Wnt3a 폴리펩티드, 리포솜 Wnt5a 폴리펩티드, 또는 리포솜 Wnt10b 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 이용하여, 골 결손 부위에 사용하기 위한 골 이식재를 생성하기 위한 방법, 공정, 조성물, 및 키트가 기재되어 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 최근에 각막내피세포의 줄기세포가 각막주변부에 존재하여 각막내피의 치유에 기여할 것이라는 보고가 있다.

[0010] 이에 본 발명에서는 TCF4가 각막내피세포의 기능, 증식, 사멸에 대해 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

[0011] 또한, CRISPR/CAS9 시스템을 통해 TCF4 유전자를 세포 내로 도입함으로써 각막내피세포질환의 치료방법을 제시하고자 하였다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 TCF4 (Transcription factor 4) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제를 제공한다.

[0014] 본 발명은 TCF4 (Transcription factor 4) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 사람각막내피세포질환 치료제를 제공한다.

[0015] 상기 본 발명의 사람각막내피세포질환 치료제에 있어서, 상기 TCF4 (Transcription factor 4)는 사람각막내피세포의 미토콘드리아 활성을 조절하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 본 발명의 사람각막내피세포질환 치료제에 있어서, 상기 치료제는 일 예로 키트 형태일 수 있다.

[0017] 상기 본 발명의 사람각막내피세포질환 치료제에 있어서, 상기 사람각막내피세포질환은, 일 예로 각막 반흔 질환 또는 각막 혼탁 질환일 수 있다.

## 발명의 효과

[0019] 본 발명의 TCF4는 사람각막내피세포에서 미토콘드리아 기능, 에너지 생산, 자가포식, 세포 증식 등의 기능을 조절하는 것으로 확인되었는데, 이는 TCF4의 사람각막내피세포 내 도입이 각막내피세포의 재생능력을 회복시켜서 각막 반흔 또는 각막 혼탁과 같은 각막내피세포의 질환을 치유할 수 있는 것을 의미한다.

[0020]

## 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 사람각막내피세포의 배양 결과 (A) 및 밀착연접(tight junction) (B)을 보여주는 사진이다.

도 2는 사람각막내피세포에서, TCF4가 OCT3/4 및 GFAP의 상위 신호인자임을 보여준다.

도 3은 사람각막내피세포에서, 베타-카테닌, GFAP, GSK3 $\beta$ 에 대한 TCF4의 영향을 보여준다.

도 4는 사람각막내피세포에서, 미토콘드리아의 기능에 대한 TCF4의 영향을 보여준다.

도 5는 사람각막내피세포에서, 세포 증식 및 세포 주기에 대한 TCF4의 영향을 보여준다.

도 6은 사람각막내피세포에서, 세포 사멸 (cell death)에 대한 TCF4의 영향을 보여준다.

도 7은 사람각막내피세포에서, TCF4와 전사인자들 간의 상호작용을 보여준다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명의 TCF4 (Transcription factor 4)는 사람각막내피세포에서 미토콘드리아 기능, 에너지 생산, 자가포식, 세포 증식 등의 기능을 조절함이 본 발명을 통해 확인되었다. 따라서, 본 발명 TCF4의 세포 내 도입은 각막내피세포의 재생능력을 회복시켜 각막 반흔 또는 각막 혼탁 등의 사람각막내피세포 질환을 치료할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명에서는 TCF4를 손상된 사람각막내피세포에 도입시켜 사람각막내피세포의 기능을 복구할 수 있는데, TCF4를 사람각막내피세포에 도입시키는 방법은 유전자 치료제 또는 단백질 치료제를 세포에 도입시키는 일반적인 방법을 사용할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 경우, 환자의 안구에 TCF4 유전자 또는 단백질을 직접 도입시킬 수 있으나, 경우에 따라, 손상된 각막내피세포를 안구로부터 분리한 후, 여기에 유전자 또는 단백질을 도입시키고, 이를 다시 안구에 자가 이식하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0025] TCF4 유전자의 세포 내로 도입은 특별히 이에 제한되지 않으나, TCF4 유전자를 직접 세포에 함입시키거나, TCF4를 발현하는 벡터로 세포를 형질전환시켜 수행할 수 있다. TCF4 유전자를 직접 세포에 함입시키는 방법은 특별한 방법으로 제한되지 않으나, TCF4 유전자 1 $\mu$ g 당 양이온성 리포좀을 2~5 $\mu$ g 혼합하여, 리포펙션(lipofection)하여 수행할 수 있다. 또한, TCF4 단백질의 세포 내 도입은 미세 주사기 등을 사용하여 수행할 수 있다.

[0026] 한편, 일 예로써, TCF4의 발현벡터는 주사용 조성물과 혼합하여 각막 반흔 질환 또는 각막 혼탁이 발생한 환자에 대해 주사 형태로 투여함으로써 구현될 수 있다. 이때, 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되거나 보존제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 또는 리포좀 제제)를 함유할 수 있다. 상기 발현벡터는 투여 직전에, 약학적 제제화가 수행될 수 있는데, 필요에 따라, 리포좀 등의 물질에 캡슐화한 제형의 형태로도 사용될 수 있다.

[0027] 상기 TCF4 유전자 및 TCF4 단백질의 투여량은, 투여 형태, 투여 경로 및 치료하려는 대상의 연령, 체중 및 증상에 따라 적절하게 결정되는데, 환자의 상태 등에 따라 안과 전문의에 의해 처방되어 처치되는 것이 바람직하다. 다만, 성인의 경우, 일반적으로 1일 투여량은 제제 안에 함유된 활성성분의 양으로 10ng 내지 100mg/kg일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 치료제는 키트 형태로 제공될 수 있는데, 제공되는 키트에는 본 발명의 TCF4 유전자 또는 TCF4 단백질 외에 이들의 세포 내 도입을 유도할 수 있는 기구 및 시약 등을 포함할 수 있다.

[0029] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기

실시에 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: TCF4 (Transcription factor 4)의 사람각막내피세포 질환 치료 용도 확인]

1. 실험방법

(1) 사람각막내피세포(HCECs) 배양

본 실험은 헬싱키 선언의 교리에 따라 이루어 졌고, 한림대학교 의료원 윤리위원회에 의해 검토되고 승인되었다. 사람각막내피세포는 전충각막이식술 후에 버려진 각막-공막 ring에서 얻어졌다. 배양을 위해 처리 될 때까지 이러한 조직은 4℃의 Optisol™-GS (Bausch and Lomb Inc., Rochester, NY)에 저장되었다. 세포는 이전에 알려진 방법에 따라 배양되었다.

(2) RNA 저해(interference)

TCF4 (Transcription factor 4), OCT3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4), GFAP (glial fibrillary acidic protein)의 발현을 저해하기 위하여 siRNA(small-interference RNA)로써, TCF4 (sc-43525), OCT3/4 (sc-36123) 및 GFAP (sc-29332)에 대한 siRNA 및 비특이적 조절 siRNA-플루오로세인 (sc-36869) (음성 대조군)을 'Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)'에서 구입하였다.

리포펙타민 3000 (Lipofectamine 3000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 10 nM 농도의 TCF4, OCT3/4, GFAP에 대한 특이적 siRNA 및 siRNA-플루오로세인 (트랜스펙션 효율의 확인을 위한 시각적 모니터링 인자이기도 함)을 사용하여 트랜스펙션시켰다.

48시간 후 트랜스펙션 효율 (transfection efficiency)는  $95.26 \pm 1.10\%$ 이었다. 트랜스펙션 48시간 후에 세포들을 검사에 이용하였다. TCF4, OCT3/4 및 GFAP의 침묵(silencing) 효과는 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

(3) TCF4 플라스미드를 이용한 트랜스펙션

TCF4 발현 증가의 효과를 알아보기 위하여 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하였다. TCF4를 위한 'CRISPR/Cas 9'는 Santa Cruz Biotechnology (sc-400607)에서 구입하였다. 트랜스펙션은 리포펙타민 3000을 사용하여 시행하였고, 48시간 후 웨스턴 블롯을 사용하여 TCF4 과발현 효과를 확인하였다.

(4) 세포 생존도 분석

세포 증식은 제조자의 프로토콜에 따라 CCK-8 어세이 (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 세포 (웰 당  $10^3$  세포)를 96-웰 플레이트에 넣고 5% CO<sub>2</sub>를 포함한 습한 분위기에서 2일간 배양하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub> 하에서 37℃에서 배양한 후, CCK-8 assay를 시행하였다.

CCK-8 용액을 첨가하지 않은 100  $\mu$ l의 배지를 공백으로 사용했다. 광학 밀도를 ELISA 리더 (SpectraMax 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 측정하고, 결과를 평균 (SD)으로 표시했다. 증식 속도는 일치하는 블랭크 값을 뺀 후 대조군의 백분율로 표현되었다.

(5) 미토콘드리아 막전위 측정  $\Delta \Psi_m$

미토콘드리아 막전위 ( $\Delta \Psi_m$ )는 JC-1 염색 (BioVision, San Francisco, CA)을 사용하여 측정되었다. 세포들은 블랙 96-웰 플레이트에 분주되어 siRNA와 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 TCF4의 발현을 저해하거나 증가시켰다.

형광은 스펙트로플루오로미터 (SFM 25, Kontron Instruments, Everett, MA)을 이용하여 여기 파장 488 nm, 방출 파장 525 nm에서 녹색형광을 측정하였고, 여기 파장 549 nm, 방출 파장 581 nm에서 적색형광을 측정하였다. JC-1의 적색/녹색 형광 비율을 사용하여 미토콘드리아 막전위를 측정하였다.

## (6) 세포 내 활성산소기 측정

세포 내 활성산소기는 DCFH-DA (dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 측정하였다. 스펙트로플루오로미터(spectrofluorometer, SFM 25, Kontron Instruments, Everett, MA)를 사용하여 여기 파장 495 nm과 방출 파장 530 nm에서 측정하였다.

## (7) ATP 생성 측정

ATP 생성은 ATP 측정 키트 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR)를 사용하여 측정하였다. 발광 (luminescence)은 LMax™ 마이크로플레이트 루미노미터 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)로 측정하였다.

## (8) 웨스턴 블롯을 사용한 단백질 발현 확인

샘플은 세포 파쇄액 (homogenate) 또는 배양액에서 얻었다. 배양액을 제거한 후, RIFA 버퍼 ((9.1 mM dibasic sodium phosphate, 1.7 mM monobasic sodium phosphate, 150 mM NaCl, [pH, 7.4], 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.03 TIU/mL aprotinin), protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)과 phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP; Roche, Basel, Switzerland)를 포함)로 세포를 처리하였다. 2000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 얻었고, -70℃에 동결하였다.

웨스턴 블롯은 기존의 방식으로 시행하였고, rabbit anti-human TCF4 antibody (sc-13027, Santa Cruz biotechnology), goat anti-human OCT3/4 antibody (sc-8629, Santa Cruz biotechnology), mouse anti-human GFAP antibody (sc-58766, Santa Cruz biotechnology), rabbit anti-human ERK1/2 antibody (ab17942, Abcam, Cambridge, MA), rabbit anti-human pERK1/2 antibody (ab4819, Abcam), rabbit anti-human GSK3β antibody (ab32391, Abcam), or rabbit anti-human pGSK3β antibody (ab75745, Abcam), rabbit anti-human SIRT1 antibody (sc-15404, Santa Cruz), rabbit anti-human β-catenin antibody (ab325572, Abcam), rabbit anti-human CDK1 antibody (ab131450, Abcam), rabbit anti-human cyclin D1 antibody (sc-718, Santa Cruz), rabbit anti-human AMP-activated protein kinase antibody (AMPK; sc-25792, Santa Cruz), rabbit anti-human phosph-AMPK antibody (pAMPK; sc-101630, Santa Cruz), rabbit anti-human LC3 antibody (PM036, MBL International, Woburn, MA, USA), mouse anti-human KLF4 antibody (Kruppel-like factor 4; MABC631, Millipore Corp.) or rabbit anti-human NFATc3 antibody (nuclear factor of activated T cells; sc-8321, Santa Cruz) 으로 일차 항체를 처리한 후, 이차 항체로 처리하고, '5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/ nitro blue tetrazolium (NBT) color development substrate (Promega, Madison, WI)'를 사용하여 발색하였다. 데이터는 이미지 분석 시스템을 통하여 분석하였다.

## (9) 통계 방법

데이터는 'Mann Whitney U' 검정에 따른 'Kruskal-wallis' 검정을 사용하여 평가했다. P 값 <0.05를 통계학적으로 의미있는 것으로 간주했다.

## 2. 실험 결과

### (1) 사람각막내피세포에서 TCF4가 OCT3/4 와 GFA의 상위 신호임을 확인

배양각막내피세포는 모자이크 형태로 배양되었다 (도 1의 A). ZO-1 (zonular occludens; green)의 형광 염색이 배양각막내피세포의 밀착연접(tight junction)을 보여준다 (blue; 도 1의 B)

GFAP, OCT3/4, TCF4의 발현은 웨스턴 블롯으로 평가되었다.

TCF4 발현은 TCF4에 대한 siRNA에 의해 감소되었으나, OCT3/4 및 GFAP에 대한 siRNA에 의해서는 변하지 않았다 (p=0.029, Mann-Whitney U test; 도 2의 A).

- [0070] OCT3/4 발현은 TCF4에 대한 siRNA 또는 OCT3/4에 대한 siRNA에 의해서는 감소하였으나 ( $p = 0.029$  양쪽 다), GFAP에 대한 siRNA에 의해서는 변하지 않았다 (도 2의 B).
- [0071] GFAP 발현은 TCF4에 대한 siRNA 또는 GFP에 대한 siRNA에 의해서 감소하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 2의 C).
- [0072] TCF4 저해(blocking)는 글리코겐 신타아제 키나아제 3 베타 (glycogen synthase kinase 3 beta)의 인산화(phosphorylation)를 감소시켰고 (GSK3 $\beta$ ;  $p=0.029$ ; 도 2의 D),  $\beta$ -카테닌(catenin)의 발현을 증가시켰다 ( $p=0.029$ ; 도 2의 E).
- [0074] **(2) 사람각막내피세포에서 TCF4는 OCT3/4, GFAP, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -카테닌의 발현을 조절함**
- [0075] si-TCF4은 TCF4 발현을 저해하였고 ( $52.61 \pm 5.43\%$ ), TCF4에 대한CRISPR/Cas9 (도 3에서 'p1'로 표시됨)은 TCF4을 과발현시켰다 ( $38.62 \pm 17.41\%$ ; 도 3의 A).  $\beta$ -카테닌은 TCF4 저해에 의해 증가하였고, TCF4 과발현에 의해 감소하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 3의 B). GFAP 발현은 FCF4의 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  모두, Mann-Whitney  $U$  test; 도 3의 C). GSK3 $\beta$ 은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 3의 D).
- [0077] **(3) 사람각막내피세포에서 TCF4은 미토콘드리아의 기능 (mitochondrial functions)을 조절함**
- [0078] 미토콘드리아의 생존능 (mitochondrial viability)은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.038$  및  $0.026$ , 각각, Mann-Whitney  $U$  test; Figure 4A).
- [0079] 미토콘드리아 막 전위 ( $\Delta \Psi_m$ )는 JC-1로 측정하였다 (도 4의 B).  $\Delta \Psi_m$ 은TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.005$  및  $0.038$ , 각각).
- [0080] 한편, 세포 내 ROS 생산은 DCF(dichlorofluorescein) 형광으로 측정하였다. 세포 내 ROS 생성은 TCF4 저해에 의해 증가하였고, TCF4 과발현에 의해 감소하였다 ( $p=0.027$  및  $0.001$ , 각각; 도 4의 C). 상대적 ATP 생산량은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.009$  및  $0.026$ , 각각; 도 4의 D).
- [0081] 한편, AMPK (Activation of AMP-activated protein kinase)는 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 4의 E).
- [0082] 한편, SIRT1(Sirtuin 1) 발현은 TCF4 저해에 의해 증가하였고, TCF4의 과발현에 의해 감소하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 4의 F).
- [0084] **(4) 사람각막내피세포에서 TCF4은 세포 증식 및 세포 주기를 조절함**
- [0085] 세포 생존능 (Cell viability)은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.001$  및  $0.005$ , 각각, Mann-Whitney  $U$  test; 도 5의 A).
- [0086] 세포 증식능 (Cell proliferation)은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.026$  및  $0.038$ , 각각; 도 5의 B).
- [0087] 세포 주기 분석 (Cell cycle analysis)에서 '% cells in S-phase'는 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.001$  양쪽 다; 도 5의 C).
- [0088] pERK1/2 (Phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2)은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  및  $0.348$ , 각각; 도 5의 D).
- [0089] CDK1 (Cyclin-dependent kinase) 발현은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 5의 E).
- [0090] 사이클린(Cyclin) D1 발현은 TCF4 저해에 의해 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다; 도 5의 F).

[0092] (5) 사람각막내피세포에서 TCF4은 세포 사멸을 조절함

[0093] 'Cleaved caspase 3' 발현은 TCF4 저해 또는 과발현에 의해 변화가 없었다 (도 6의 A).

[0094] 한편, 'Autophagy ratio of LC3-II/LC3-I expression'에 의해 평가되었는데 (도 6의 B), TCF4 저해는 LC3-II 발현을 증가시켰다 ( $p=0.029$ , Mann-Whitney  $U$  test).

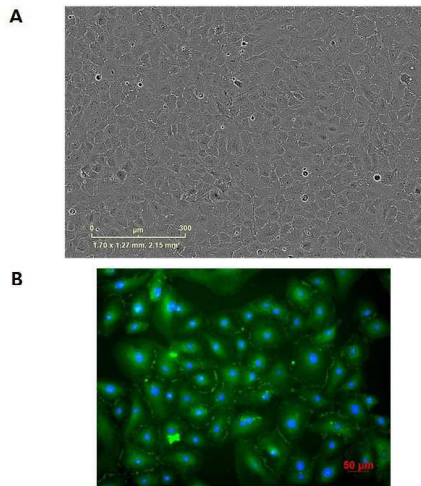
[0096] (6) 사람각막내피세포에서 TCF4와 전사 인자들 (transcriptional factors) 간의 상호 작용

[0097] OCT3/4 발현은 TCF4 저해에 의하여 감소하였고, TCF4 과발현에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  양쪽 다, Mann-Whitney  $U$  test; 도 7의 A).

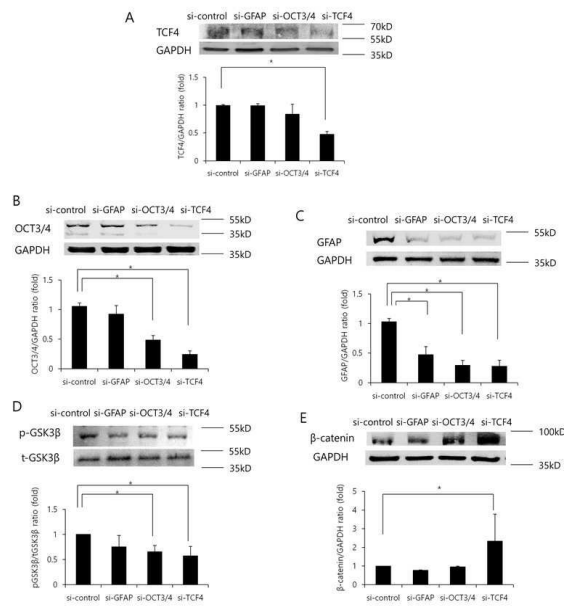
[0098] KLF4 (Kruppel-like factor 4) 와 NFAT (nuclear factor of activated T-cells) 발현은 TCF4 저해에 의해 증가하였다 ( $p=0.029$  모두; 도 7의 B 및 C).

## 도면

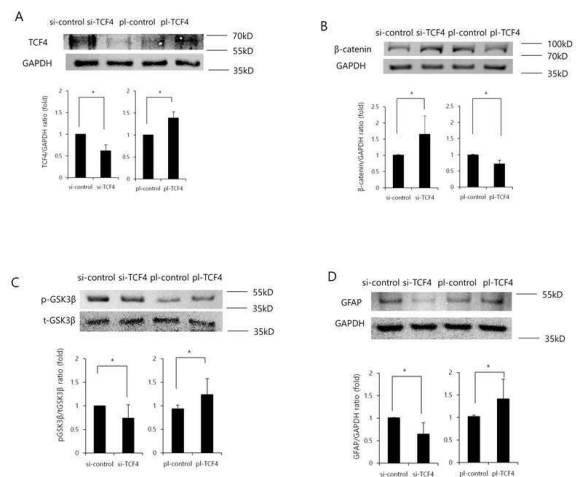
### 도면1



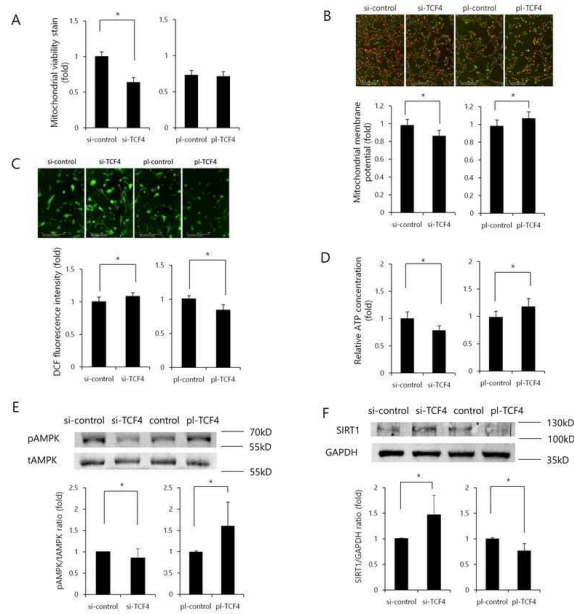
## 도면2



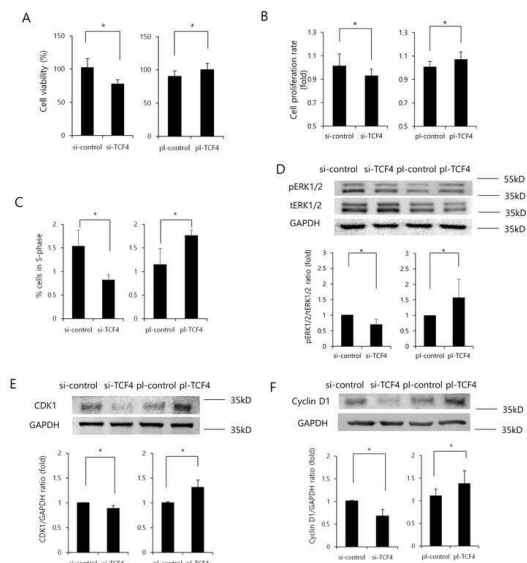
## 도면3



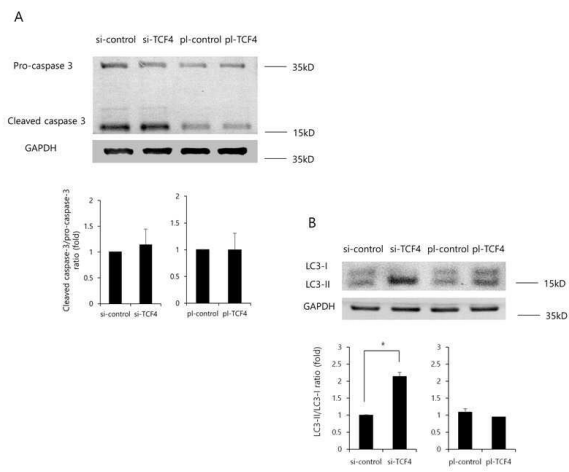
# 도면4



# 도면5



## 도면6



## 도면7

