



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0105792  
(43) 공개일자 2008년12월04일

(51) Int. Cl.

A61F 2/06 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01) A61F 2/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0053826

(22) 출원일자 2007년06월01일

심사청구일자 2007년06월01일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

윤주현

서울 강남구 대치2동 미도 아파트 209-1302

(74) 대리인

양부현, 김승진

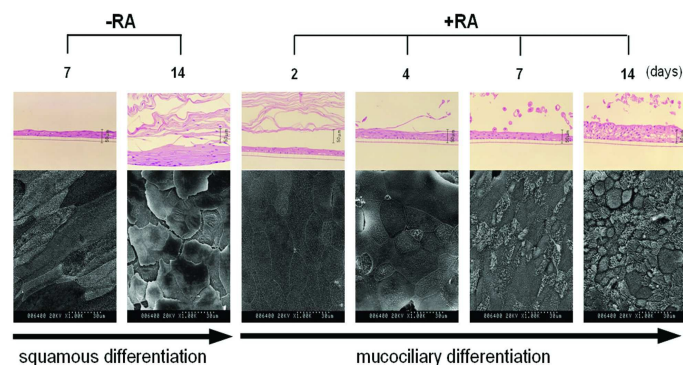
전체 청구항 수 : 총 9 항

## (54) 점막내강 재건용 이식물

### (57) 요약

본 발명은 편평상피세포(squamous epithelial cell)를 유효성분으로 포함하는 점막의 결손부위를 재건하는 점막내강(mucosal lumen) 재건용 이식물(implant)에 관한 것이다. 본 발명의 이식물은 환부(즉, 점막의 결손부위)에 이식된 후, 점액섬모상피세포로 분화되며 환부 주위의 점막과 같은 정상적인 점막으로 재생된다. 또한, 본 발명의 이식물은 환부에 이식된 후, 피부이식 후에 흔히 경험하는 가피의 형성이나 점액의 저류와 같은 부작용이 없다. 본 발명의 이식물은 특히 호흡기 점막내강의 결손을 재건하는 데 유리하다.

### 대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

편평상피세포(squamous epithelial cell)를 유효성분으로 포함하는 점막내강(mucosal lumen) 재건용 이식물(implant).

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 편평상피세포는 (a) 상피세포를 레티노인산(RA)-함유 배지에서 배양 및 증식하는 단계; 및 (b) 상기 증식된 상피세포를 레티노인산-부재 배지에서 배양하여 편평상피세포로 분화시키는 단계에 의해 인 비트로 제조된 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 편평상피세포의 제조 과정은 피더 세포층을 이용하지 않는 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 편평상피세포는 점액섬모상피세포와 비교하여 높은 *코르니핀-a*(*cornifin-a*) 유전자 발현을 나타내고 낮은 *MUC5AC* 및 *MUC8* 유전자 발현을 나타내는 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 편평상피세포는 생체 내에 이식되는 경우 점액섬모상피세포(mucociliary epithelial cells)로 분화되는 것을 특징으로 하는 점막내강재건용 이식물.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 편평상피세포는 자가 세포인 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 편평상피세포는 코편평상피세포(nasal squamous epithelial cell)인 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 점막내강은 호흡기(airway)에 있는 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

### 청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 이식물은 편평상피 세포판 형태를 갖는 것을 특징으로 하는 점막내강 재건용 이식물.

## 명 세 서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 점막내강 재건용 이식물, 특히 호흡기 점막 재건용 이식물에 관한 것이다.
- <6> 두경부 특히 호흡기 점막 결손의 복잡한 재건 과정은 비부비동(sinonasal) 또는 기관(tracheal) 종양을 갖는 환자에게 있어서 필수적이다. 이러한 외과적 결손은 유리근피판이식편과 피부이식을 병합하여 점막결손부위에 이식해 줌으로써 성공적으로 재건될 수 있다(1,2). 호흡기 결손, 특히 기도종양 및 협착의 경우 절제 후 생긴 점막결손의 재건에 피부를 이식재료로 사용할 수 있다(3).
- <7> 현재까지, 피부는 호흡기 점막내강의 결손을 재건하는 재료로써 가장 널리 사용되고 있다(4,5). 그러나 호흡

기의 내강(lumen)을 따라 존재하는 섬모원주상피에 대한 대체물로서의 피부의 이용은 심각한 몇 가지 문제점이 있다. 상기 문제점은 이식물의 위축, 박리(desquamation), 털의 재성장 및 불쾌한 냄새 등이다(6,7).

- <8> 섬모원주상피는 호흡기 내강의 재건에 생리학적으로 가장 적합한 조직이기 때문에, 본 발명자들은 배양된 코 섬모원주상피를 그대로 재건에 사용하려 하였으나 성공하지 못하였는데, 그 이유는 배양된 섬모원주상피세포는 봉합할 수 있을 정도로 충분한 강도를 가지고 있지 않기 때문이다.
- <9> 본 발명자들의 종전의 실험에서, 레티노인산-결여 배양 조건 하에서 코 점액섬모상피세포가 피부와 같은 편평상피(squamous epithelium)로 분화될 수 있다는 것을 규명하였고(8), 레티노인산을 배지에 보충시켜줌으로써 편평상피로부터 다시 점액섬모상피(mucociliary columnar epithelium)로 회복됨을 관찰하였다.
- <10> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <11> 본 발명자들은 점막내강의 결손, 특히 호흡기 점막의 내강 재건(reconstruction)을 효율적으로 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 종래 피부 이식물이 가지고 있는 문제점 없이 점막결손을 효율적으로 재건할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <12> 따라서 본 발명의 목적은 점막내강 재건용 이식물을 제공하는 데 있다.
- <13> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 발명의 구성 및 작용

- <14> 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 편평상피세포(squamous epithelial cell)를 유효성분으로 포함하는 점막내강(mucosal lumen) 재건용 이식물(implant)을 제공한다.
- <15> 본 발명자들은 점막내강, 특히 호흡기 점막내강 재건(reconstruction)을 효율적으로 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 편평상피세포를 포함하는 이식물을 점막결손 부위에 이식하는 경우, 가피(crust)의 형성과 같은 종래 피부이식이 가지고 있는 문제점 없이 점막결손을 효율적으로 재건할 수 있음을 확인하였다.
- <16> 본 발명은 생체 내의 기관 중에서 점액섬모 세포가 덮고(lining) 있는 호흡기관에 적용된다.
- <17> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 편평상피세포는 (a) 상피세포를 레티노인산(RA)-함유 배지에서 배양 및 증식하는 단계; 및 (b) 상기 증식된 상피세포를 레티노인산-부재 배지에서 배양하여 편평상피세포로 분화시키는 단계에 의해 제조된다.
- <18> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 편평상피세포를 얻는 과정에서 단계 (b)는 두 단계로 실시된다.
- <19> 처음 단계는 서브머지(submerge) 조건에서 배양된다. 서브머지 조건 하에서, 배지에 씨딩(seeding)된 상피세포는 가능한 최대 양의 배양액으로 덮여 있는 상태에서 배양된다. 이 조건에서는 상피세포에 영향을 주는 요소들이 배양액을 통하여 작용을 하게 된다.
- <20> 이어, 두 번째 단계는 반-건조(semi-dry) 조건에서 실시된다. 반-건조 조건 하에서, 배지에 씨딩된 상피세포는 가능한 최소 양의 배양액으로 덮여 있는 상태에서 배양된다. 이 조건에서는 상피세포 층 바로 위에 배양액이 가능한 얇게 덮여 있게 되며, 상피세포층에 영향을 주는 요소들은 배양액과 공기를 통하여 작용을 하게 된다.
- <21> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 편평상피세포의 제조 과정은 피더(feeder) 세포층(예컨대, 3T3 세포)을 이용하지 않는다. 이러한 특징은 본 발명의 이식물이 인체에 적용된 경우 이질 세포에 의한 부작용 발생을 제거하는 이점을 갖게 한다.
- <22> 코상피세포(nasal epithelial cells)로부터 코편평상피세포(nasal squamous epithelial cells) 또는 코편평상피세포층(nasal squamous epithelium)을 얻는 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따라, 편평상피세포의 제조과정을 설명하면 다음과 같다:

- <23> 코점막 시료를 코로부터 얻은 다음 코상피세포를 분리(dissociation)하기 위하여, 코점막 시료를 프로테아제로 처리한다. 이어, 분리된 코 상피세포 시료로부터 섬유아세포, 내피세포 및 적혈구 세포를 제거한다. 그런 다음, 하이드로코르티손 21-해미숙시네이트, 인슐린, 트랜스페린, 에피네프린 하이드로클로라이드, 3,3',5-트리요오도타이로닌, 젠타마이신 설페이트 및 암포테리신 B를 포함하는 호흡기 상피 배지에, 상피성장인자, all-trans-레티노인산 및 소혈청 알부민이 보충된 배지에서 코상피세포를 배양 및 증식시킨다. 그리고 나서, 배양된 코상피세포를 레티노인산을 포함하지 않는 호흡기 상피 배지에서 배양하여 편평상피세포를 얻는다. 편평상피세포를 얻기 위한 배양은, 크게 두 단계로 실시하는 것이 바람직하다. 처음 단계에서는 서브멀지(submerge) 조건에서 배양한다. 서브멀지 조건 하에서, 배지에 씨딩된 상피세포는 가능한 최대 양의 배양액으로 덮여 있는 상태에서 배양된다. 이어, 두 번째 단계는 반-건조(semi-dry) 조건에서 실시된다. 반-건조 조건 하에서, 배지에 씨딩된 상피세포는 가능한 최소 양의 배양액으로 덮여 있는 상태에서 배양된다.
- <24> 이렇게 하여 수득한 편평상피세포는 점막섬모상피세포와 비교하여 높은 코르니핀- $\alpha$ (cornifin- $\alpha$ ) 유전자 발현을 나타내고 낮은 MUC5AC 및 MUC8 유전자 발현을 나타낸다. 보다 상세하게는, MUC5AC 유전자 및 MUC8 유전자는 본 발명에서 이용되는 편평상피세포에서 거의 발현되지 않는다.
- <25> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 편평상피세포는 케라틴화(keratinized) 편평상피세포이다.
- <26> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 편평상피세포는 생체 내에 이식되는 경우 점액섬모상피세포(mucociliary epithelial cells)로 분화되어 점막결손을 재건한다.
- <27> 본 발명에서 이용되는 편평상피세포로는 타가 세포 또는 자가 세포를 이용할 수 있지만, 바람직하게는 환자 자신으로부터 분리한 자가 세포이다. 자가 편평상피세포를 이용하는 경우에는 면역 거부 반응이 발생하지 않아 매우 유리하다.
- <28> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 점막결손 재건용 이식물은 호흡기 점막결손의 재건에 적용된다. 이 경우, 코편평상피세포(nasal squamous epithelial cell)가 이용된다.
- <29> 본 발명의 이식물은 환부(즉, 이식될 위치)의 상태, 모양 및 크기 등에 따라 다양한 형태로 제작될 수 있다. 바람직하게는, 이식물은 편평상피 세포판 형태를 갖는다. 편평상피 세포판은 두께가 얇기 때문에 취급하는데 어려움이 있다. 따라서 환부에 편평상피 세포판을 이식하는 경우, 마셀린 거즈(petrolatum gauze) 또는 생분해성 고분자화합물 등을 지지체로 이용하여 편평상피 세포판을 이식하는 것이 바람직하다.
- <30> 본 발명의 이식물이 이식될 점막결손의 크기가 큰 경우(예컨대, 비부비동 또는 기관 종양 환자로부터 종양을 제거한 경우), 당업계에 통상적으로 알려져 있는 3차원 유리근피판이식편 기술(Piantanida, R., et al., Reconstruction of major orbital-maxillary defects with free latissimus dorsi myocutaneous flap. *Facial Plast. Surg.* 15:297(1999); Pribaz, J.J., et al., *Plast. Reconstr. Surg.* 93:285(1994))을 이용하여 본 발명의 이식물을 점막결손 부위에 적용할 수 있다.
- <31> 본 발명의 이식물은 점막결손 부위에 직접 이식할 목적으로 개발되었다. 본 발명의 이식물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 이식되는 편평상피세포의 수는 특별히 제한적이지 않으며, 예를 들어  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^{10}$  세포의 수로 편평상피세포를 이식할 수 있다.
- <32> 환부에 이식된 본 발명의 이식물에 포함된 편평상피세포는 점액섬모 상피세포로 분화되고 이식부위에서 주위의 세포와 단단한 결합(tight junction)을 이루어 정상적인 점막을 재생하여 점막내강을 재건한다.
- <33> 본 발명의 점막결손 재건용 이식물은 점액섬모 세포가 덮고 있는 점막내강 구조를 갖는 기관에 적용될 수 있다. 예를 들어, 기도(호흡기관), 위, 소장 및 대장에 적용되어 점막내강을 효과적으로 재건할 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 점막내강 재건용 이식물은 호흡기 내강의 재건에 이용된다.
- <34> 본 발명의 점막내강 재건용 이식물은 종래에 이용되었던 피부 이식물과 다르게, 이식 후 가피(crust) 형성 또는 점액 저류(mucus stagnation)를 거의 유도하지 않는 장점이 있다. 본 발명의 이식물은 생체 내에 이식되어 점액섬모 상피세포를 형성하고, 이 상피세포 상에 있는 섬모의 운동 때문에 가피 형성을 억제하게 된다.
- <35> 현재까지, 점막내강의 재건에 이용된 물질로서 피부 및 점액섬모상피세포가 있다. 그러나 피부 이식물은 위축, 박리, 털의 재성장 및 가피의 형성과 같은 문제점을 가지고 있고, 점액섬모상피세포 이식물은 강도가 낮

기 때문에 취급하기가 어려울 뿐만 아니라 이식 위치에서 잘 봉합되지 않는다.

- <36> 본 발명의 이식물은 상술한 피부 및 점막섬모상피세포 이식물의 문제점을 완벽하게 해결한다. 즉, 본 발명의 이식물은, 위축, 박리 및 가피의 형성과 같은 문제점이 없으며, 충분한 강도를 가지고 있어 취급하기가 점액섬모상피세포 이식물보다 용이하며, 이식 위치에서 주위세포와 단단한 결합을 형성한다.
- <37> 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- <38> (a) 본 발명의 이식물은 점막내강을 재건하기 위하여 편평상피세포를 유효성분으로 이용한다.
- <39> (b) 본 발명의 이식물은 환부에 이식된 후, 점액섬모 상피세포로 분화되며 주위의 세포와 단단한 결합(tight junction)을 이루어 정상적인 점막을 재생한다.
- <40> (c) 본 발명의 이식물은 환부에 이식된 후, 점액섬모상피세포로 분화되며 상피세포 상의 섬모 운동 때문에 가피 형성 또는 점액 저류를 거의 유도하지 않는다.
- <41> (d) 본 발명의 이식물에 이용되는 편평상피세포는 피더 세포층 없이 배양 및 증식이 가능하기 때문에, 본 발명의 이식물은 캐리어-부재(carrier-free) 형태로 제작될 수 있어, 캐리어에 의한 부작용을 제거할 수 있다.
- <42> (e) 본 발명의 이식물은 특히 호흡기 내강을 재건하는 데 유리하다.
- <43> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

#### <44> 실시예

##### <45> 실험 재료 및 실험 방법

##### <46> 환자로부터 코상피세포의 분리 및 증식

<47> 본 연구에 기재된 과정에 대하여 연세대학교 의과대학의 IRB(Institutional Review Board)의 허가를 얻은 다음, 본 발명자들은 3명의 상악암(maxillary cancer) 환자의 동의를 얻어 연구를 진행하였다. 코상피세포(nasal epithelial cells)의 분리 및 증식을 위하여, 우선, 코점막 시료를 상악동 종양(선양낭성암종을 가진 1명의 환자 및 편평세포암종을 가진 2명의 환자)의 반대쪽의 중비도(middle turbinate)로부터 수득하였다. 상피세포를 분리하기 위하여, 코점막 시료를 페니실린 G 소듐 (50 IU/ml) 및 스트렙토마이신 설페이트(50 µg/ml)로 보충된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's nutrient F12)의 1:1 혼합 배양액에서 1.0% Pronase(타입 XIV 프로테아제, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 4℃에서 16-20시간 동안 처리하였다. 분리된 상피세포를 항생제-함유 DMEM/F12에서 3회 세척하고, 항생제 및 10% 우태아혈청으로 보충된 DMEM/F12에 현탁시켰다. 이어, 세포를 플라스틱 배양접시에 37℃에서 1시간 동안 플레이팅하여 섬유아세포, 내피세포 및 적혈구 세포를 제거하였다. 현탁된 상피세포를 플레이팅 하고, 배양접시 당  $3 \times 10^4$  세포 밀도( $\text{cm}^2$  당 500 세포)로 재씨딩 하였다. 이용된 배지는 호흡기 상피 배지(BEGM; Clonetics Corp., Walkersville, MD)로서, 이 배지는 하이드로코르티손 21-헤미숙시네이트 (0.5 µg/ml), 인슐린 (5 µg/ml), 트랜스페린 (10 µg/ml), 에피데르핀 하이드로클로라이드 (0.5 µg/ml), 3,3',5-트리요오도타이로닌(6.5 ng/ml), 젠타마이신 설페이트 (50 µg/ml) 및 암포테리신 B (50 µg/ml)을 포함하며, 상피성장인자 (EGF; 25 ng/ml; Collaborative Research, Bedford, MA), all-trans-레티노인산( $10^{-7}$  mol/L; Sigma-Aldrich) 및 소혈청 알부민 (1.5 µg/ml; Sigma-Aldrich)으로 보충된 것이다. 배양물을 37℃에서 5% 이산화탄소의 배양기 안에서 유지하였다. 씨딩한 이후, 배지를 첫 번째 일자에 교체하였고, 이어 배양이 50-60% 컨플루언시에 도달할 때까지 배지를 2일에 한번씩 교체 하였다. 그런 다음, EDTA(Clonetics Corp., San Diego, CA)를 이용하여 세포를 분리하였다. 세포수를 hemocytometry로 결정하고, 세포를 2회 플레이팅 하였다. 상기 패시지 2 세포 배양물이 50-60% 컨플루언시에 도달할 때, 세포를 다시 분리시켰다(9).

##### <48> 편평세포의 인 비트로 분화 유도

<49> 0.45 µm 동공 크기를 가지는 24.5-mm 트랜스웰 클리어 배양 인서트(CostarCo., Cambridge, MA)의 표면에 있는 배지 0.5 ml에 환자로부터 얻은 패시지 2 코상피세포(배양 당  $10^5$  세포,  $\text{cm}^2$  당  $2 \times 10^4$  세포)를 씨딩하였다.

<50> 세포를 상술한 보충물의 동일 농도를 포함하는 BEGM:DMEM의 1:1 혼합배양액(0.5 ng/ml EGF을 포함하고, 레티노



인산은 포함되지 않음)에서 배양하였다. 처음 9일 동안은 서브컬처 조건에서 배양하였고, 배지를 1일째에 교체한 다음 이어 2일에 한번씩 교체하였다. 배양 9일째에 위쪽 배지를 제거하고 단지 아래쪽 부분으로부터만 배양물을 피딩하여 공기-액체 경계배양을 형성시켰다. 편평 상피를 얻기 위하여, 컨플루언시 이후 14일까지 공기-액체 경계배양의 형성 후 매일 레티노인산-결여 배지를 교체하였다.

<51> 전박 유리근피판이식편 상에 캐리어-부재 코상피 세포판의 이식 및 재건

<52> 세포 배양이 컨플루언시에 도달하고 14일째에, 배양된 코편평상피를, 거상기를 이용하여 각각의 배양 인서트로부터 들어 올리고, 바셀린 거즈 상에 놓은 다음, 오른쪽 전박 유리근피판이식편의 안쪽에 봉합하였고(도 3c 및 3d), 이어 재건수술을 위하여 코의 한 면에 위치시켰다. 배양된 코편평상피 이식 및 피부 이식(호흡기 내강의 재건을 위해 종종 이용됨, 10)의 임상적 결과를 비교하기 위하여, 배양된 코상피 아래쪽에 우측 넙적다리로부터 얻은 피부를 이식하였다. 10일 후, 악안면재건 수술을 실시하였다. 단계적 수술을 한 이유는 배양된 코편평세포판이 이식후 생각하는 지 여부를 재건술 전에 알아보기 위함이었다. 생착이 잘 되었음을 확인한 후 본 발명자들은 상악골과 피부를 포함하는 종양을 완전하게 제거하였다. 최종적으로, 배양된 코편평상피가 이식된 전박 유리근피판이식편을 상악골을 제거한 점막결손 부위에 봉합하여 재건하였는데 이식된 세포판 및 피부 이식물이 제거된 비강의 한쪽 면에 위치하도록 하였다(도 3e).

<53> MUC5AC, MUC8 및 코르니핀-α에 대한 RT-PCR 증폭

<54> 다음과 같은 공지의 서열을 이용하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제작하였다: 점액 분화 표식자(9), mucin 유전자 5AC (MUC5AC GenBank accession No. U06711, 680 bp, 5' 프라이머: TCCGGCTCCATCTTCTCC, 3' 프라이머: ACTTGGGCACTGGTGCTG), 섬모분화 표식자(11) mucin 유전자 8 (MUC8 GenBank accession No. U14383, 239 bp, 5' 프라이머: ACAGGGTTTCTCCTCATTG, 3' 프라이머: CGTTTATCCAGCACTGTTC), 및 편평상피세포 표식자, 코르니핀-α (GenBank accession No. BC056240, 172 bp, 5' 프라이머: CATTCTGTCTCCCCAAAAA, 3' 프라이머: ATGGGGGTATAAGGGAGCTG). β2 마이크로글로불린에 대한 올리고뉴클레오타이드 암플리머(β2M Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA)을 RT-PCR에 대한 대조군 유전자로 이용하였다. RT-PCRs은 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Wellesley, MA)를 이용하였으며 제조사의 추천방법에 따라 실시하였다. MUC8 및 코르니핀-α에 대해서는 어닐링을 55℃에서 1분 동안 실시하였고, MUC5AC 및 β2M에 대해서는 60℃에서 1분 동안 실시하였다. 신장반응은 72℃에서 1분 동안 실시하였다. 비교 속도론적 분석을 실시하여 각각의 배양 세트에서 각각의 유전자에 대한 mRNA 레벨을 결정하였다. 50 ng/ml 에티뮴 브로마이드를 포함하는 2% Seakem 아가로스 젤 (FMC; Rockland, ME) 상에서 PCR 산물을 전기영동으로 분리 하였고, Polaroid Type 55 필름에 촬영 하였다. 동일한 실험을 3회 반복하였다.

<55> 조직학적 검사, 면역형광 염색 및 주사 전자 현미경 분석

<56> 조직학적 형질을 결정하기 위한 생시료를 얻기 위하여, 재건 수술 후 1개월 및 3개월의 간격으로, 내시경 하에서 코조직 생검을 실시하였다. 시료를 10% 중성 완충 포르말린에서 고정시키고, 5 μm 두께로 절편을 만든 다음, 헤마톡실린-에오신으로 염색하였다. 면역형광 염색을 위하여, 인접 절편을 단일클론 항-p63 항체 (4A4, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 및 플루오레세인 이소티오시아네이트-표지 이차항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA)로 염색하였다. 동일농도의 비특이적 IgG를 음성 대조군으로 사용하였다. 주사전자 현미경 분석을 위하여, 시료를 냉장된 2.5% 글루타르알데하이드에 4-6시간 동안 노출시켜 고정시키고, 0.1 M 포스페이트-완충 염수로 세척하였다. 세포를 1% 오스뮴 테트록사이드에 2시간 동안 노출시켜 후-고정을 실시하였다. 이어, 시료를 주사전자현미경(H-800, Hitachi, Ibaraki, Japan) 하에서 관찰하였다.

<57> 실험 결과

<58> 편평상피의 인 비트로 유도 및 레티노인산에 의한 점액섬모상피로의 형질 변화

<59> 레티노인산-부재 배지에서 코상피세포를 케라틴 층을 포함하는 편평상피로 완전히 분화시켰다(도 1). 완전히 편평상피로 분화된 세포에 레티노인산을 처리함으로써, 레티노인산 처리 2일 후부터 케라틴화 편평상피로부터 케라틴 층이 벗겨지기 시작하였고, 분화된 편평상피세포는 처리 4일째까지 박리되었다. 처리 7일째에, 상피는 섬모를 갖는 입방형의 상피로 분화되었고, 이는 궁극적으로 풍부한 섬모를 갖는 섬모원주상피로 분화되었다(도 1).

<60> 코상피세포에서 형질 변화 동안의 편평 및 점액섬모 분화 표식자의 발현

- <61> 레티노인산-부재 배양에서, *MUC5AC* 및 *MUC8* 유전자 발현은 시간이 경과함에 따라 감소하였고, *코르니핀-a* 유전자 발현은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 케라틴화 편평상피에서, *MUC5AC* 및 *MUC8* 유전자는 최소한 수준으로 발현되었고, *코르니핀-a* 유전자 발현은 높았다. 그러나, RA 처리 후, *코르니핀-a* 유전자 발현은 급격하게 감소하였고, *MUC5AC* 및 *MUC8* 유전자 발현은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 점액섬모상피에서, *코르니핀-a* 유전자는 최소한 수준으로 발현되었고, *MUC5AC* 및 *MUC8* 유전자는 높은 수준으로 발현 되었다(도 2).
- <62> 편평상피 세포판의 제작, 생체 이식 후 세포판의 생착 및 형질 변화
- <63> 종전에 본 발명자들은 이식을 위하여 점액섬모상피 세포판을 이용하였으나, 이 세포판은 이식을 위한 봉합을 할 정도로 강도가 높지 않았다. 그러나, 배양된 편평상피 세포판(도 3a 및 3b)은 재건 시술 시 이식근육편에 잘 봉합되었으며, 이는 시술 현미경 하에서 관찰되었다(편평상피 세포판 및 피부 이식물의 위치에 대한 도면, 도 3c, 3d 및 3e).
- <64> 상피세포판은 재건 시술 시에 케라틴 층을 포함하는 전형적인 편평 상피의 표현형을 나타내었다(도 4a). 시술 후 1개월까지, 이식된 편평 상피 세포판은 입방형 상피로 분화되었다(도 4c). 시술 후 3개월째에, 입방형 상피는 섬모원추 상피로 더 분화되었고(도 4d 및 4f), 이는 인간 호흡기 상피의 전형적인 표현형질이다. 시술 후 3개월째에, 호흡기 내강 재건을 위하여 피부 이식물이 이용되는 경우에 일반적으로 관찰되는 가피(crust) 또는 점액 저류(mucus stagnation)가 관찰되지 않았다. 또한, p63을 발현하는 기저세포의 수가 증가하여 기저세포의 대부분은 p63-양성을 나타내었다(도 4b, 4e).
- <65> 재건 시술 후 1년째에 70-도 내시경에 의해 얻은 내시경 이미지에 의하면(도 3f), 비강의 위쪽에 배양된 코편평 상피(흑색 화살표)가 이식되었고 아래쪽에는 비강에 피부(백색 화살표)가 이식되었음을 알 수 있다. 편평상피 세포판으로 이식된 위치는 정상적인 외형을 갖는 비점막으로 재생되었음을 명확하게 확인할 수 있다. 자가 코 상피세포가 세포판 이식에 이용되었기 때문에, 점막에서 면역반응 또는 숙주 거부 반응은 나타나지 않았다. 가장 중요하게는, 모든 3건의 사례에서 12개월의 기간 동안 임상적 이상 증후가 없었다.

### 발명의 효과

- <66> 위에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명의 이식물은 환부에 이식된 후, 점액섬모상피세포로 분화되며 주위의 세포와 단단한 결합(tight junction)을 이루어 정상적인 점막으로 재생된다. 또한, 본 발명의 이식물은 환부에 이식된 후, 점액섬모상피세포로 분화되며 상피세포 상의 섬모 운동 때문에 가피 형성 또는 점액 저류를 거의 유도하지 않는다. 본 발명의 이식물은 특히 호흡기 내강의 점막결손을 재건하는 데 유리하다.
- <67> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

### <68> 참조 문헌

- <69> 1. Piantanida, R., Roselli, R., Pellini, R., Ferrario, F., Boschini, P., and Spriano, G. Reconstruction of major orbital-maxillary defects with free latissimus dorsi myocutaneous flap. *Facial Plast. Surg.* 15, 297, 1999.
- <70> 2. Pribaz, J.J., Morris, D.J., and Mulliken, J.B. Three-dimensional folded free-flap reconstruction of complex facial defects using intraoperative modeling. *Plast. Reconstr. Surg.* 93, 285, 1994.
- <71> 3. Duff, B.E., Wenig, B.L., Applebaum, E.L., Yeates, D.B., Wenig, B.M., and Holinger, L.D. Tracheal reconstruction using an epithelial equivalent. *Laryngoscope* 104, 409, 1994.
- <72> 4. Andhoga, M.A., Wilson, G.R., McLaughlin, W., and McLean, N.R. Split-thickness skin grafted stent for upper airway patency after medial maxillectomy. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31, 385, 1993.
- <73> 5. Eliachar, I., Sebek, B.A., Levine, S., and Tucker, H.M. Histologic changes in skin implanted into the larynx and trachea by myocutaneous flap reconstruction. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 93, 754, 1985.
- <74> 6. Conley, J.J. Regional skin flaps in partial laryngectomy. *Laryngoscope* 85, 942, 1975.
- <75> 7. Toohill, R.J. Autologous graft reconstruction of the larynx and upper trachea. *Otolaryngol. Clin.*

North Am. 12, 909, 1979.

- <76> 8. Yoon, J.H., Koo, J.S., Gray, T., Guzman, K., and Nettesheim, P. Lysozyme expression during metaplastic squamous differentiation of retinoic acid-deficient human tracheobronchial epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 20, 573, 1999.
- <77> 9. Yoon, J.H., Kim, K.S., Kim, S.S., Lee, J.G., and Park, I.Y. Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: Expression of mucin and lysozyme. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 109, 594, 2000.
- <78> 10. Santamaria, E., Granados, M., and Barrera-Franco, J.L. Radial forearm free tissue transfer for head and neck reconstruction: Versatility and reliability of a single donor site. Microsurgery 20, 195, 2000.
- <79> 11. Kim, C.H., Kim, H.J., Song, K.S., Seong, J.K., Kim, K.S., Lee, J.G., and Yoon, J.H. MUC8 as a ciliated cell marker in human nasal epithelium. Acta Otolaryngol. 125, 76, 2005.
- <80> 12. Yoon, J.H., Moon, H.J., Seong, J.K., Kim, C.H., Lee, J.J., Choi, J.Y., Song, M.S., and Kim SH. Mucociliary differentiation according to time in human nasal epithelial cell culture. Differentiation 70, 77, 2002.
- <81> 13. Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., and Tano, Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autogenous oral mucosal epithelium. New Engl. J. Med. 351, 1187, 2004.
- <82> 14. Hansbrough, J.F., Cooper, M.L., Cohen, R., Spielvogel, R., Greenleaf, G., Bartel, R.L., and Naughton, G. Evaluation of biodegradable matrix containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice. Surgery 111, 438, 1992.
- <83> 15. Merguerian, P., Chavez, D.R., and Hakim, S. Grafting of cultured uroepithelium and bladder mucosa into deepithelized segments of colon in rabbits. J. Urol. 152, 671, 1994.
- <84> 16. Best, C.D., Lowe, R., Shu, J., and Terris, M.K. Comparison of the breaking strength of polyglactin mesh in urine, serum, and cell culture media. Urology 53, 1239, 1999.

### 도면의 간단한 설명

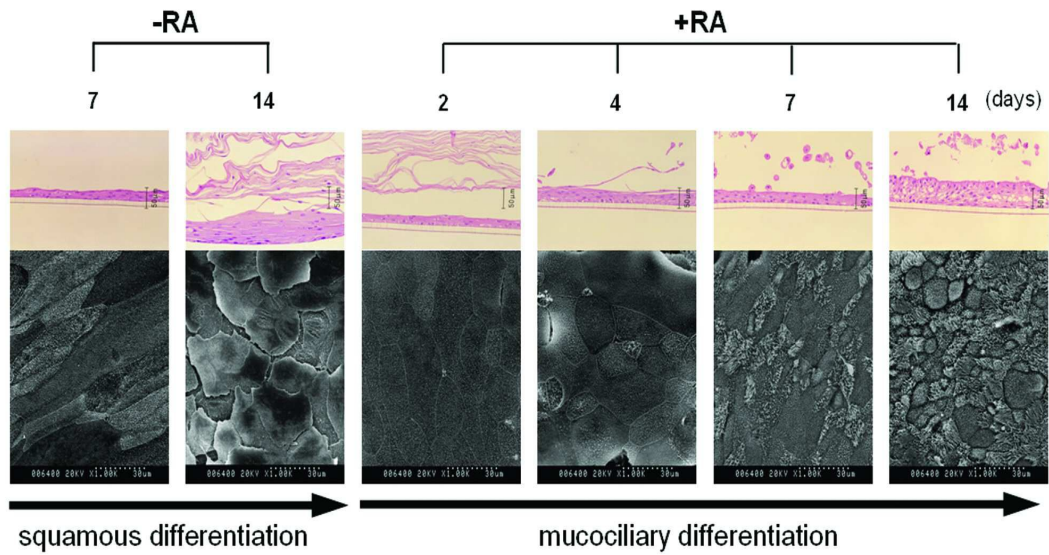
- <1> 도 1은 인간 코상피세포로부터 케라틴화 편평상피의 생성 및 레티노인산(retinoic acid)에 의한 편평상피로부터 점액섬모 상피로의 분화를 조직학적 및 주사전자 현미경으로 분석한 결과이다.
- <2> 도 2는 코상피세포에서 형질 변화 동안의 편평상피 및 점액섬모상피 분화의 표식자에 대한 역전사효소-중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석 결과이다.
- <3> 도 3은 전박 유리근피판이식편 위에 고식적인 피부이식과 배양된 코 편평상피 세포판을 이용한 악안면 재건(maxillofacial reconstruction)의 예를 보여 준다. (A) 거상상승(elevation) 후 재건에 사용될 실제 배양된 편평상피 세포판 (2.4 cm 직경). (B) 편평상피 세포판의 조직학적 분석 결과. (C) 재건 수술 10일 전에 상악동암 환자의 전박 근육 상에 배양된 편평상피 세포판을 미리 이식하였다(흑색 화살표). (D) 전박 상에 있는 배양된 편평상피(흑색 화살표) 세포판에 대한 모식도이다. 점원은 피부가 이식될 부위를 나타낸다. (E) 전박 유리근피판이식편으로 재건 수술을 하는 모식도이다. 배양된 코상피 세포판(흑색 화살표) 및 피부 이식편(S)이 나타나 있다. (F) 재건 수술 1년 후 70-도 내시경을 이용하여 얻은 이미지이다. 피부가 이식된 위치(백색 화살표) 및 배양된 코편평상피가 이식된 위치(흑색 화살표)가 관찰된다. 배양된 코편평상피가 이식된 위치는 건강하고 정상적인 코 점액섬모상피로 분화되었음을 알 수 있다. 이 결과는 3건의 사례의 대표적인 예이다.
- <4> 도 4는 이식된 편평상피 세포판의 형질 변화를 나타낸다. (A) 이식 전 편평상피세포의 조직학적 소견. (B) 이식할 세포판에서 기저세포(basal cells)를 나타내는 p63 단백질의 면역형광 염색 결과이다. (C) 재건 수술 1개월 후 편평상피세포의 조직학적 분화 소견. (D) 재건 수술 3개월 후 편평상피세포가 모두 점액섬모상피세포로 분화되었음을 보여주는 조직학적 소견. (E) 세포판의 생착 후 기저세포의 증가를 보여주는 p63 단백질의 면역형광 염색. (F) 재건 수술 3개월 후 점액섬모상피세포로 완전히 분화된 세포판 이식부위의 주사전자현미



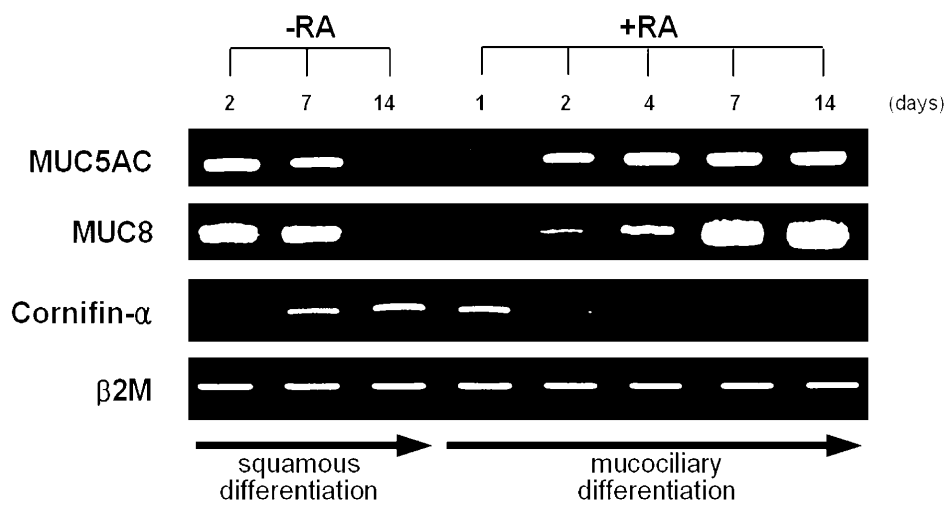
경 소견. 이 결과는 3건의 사례의 대표적인 예이다.

## 도면

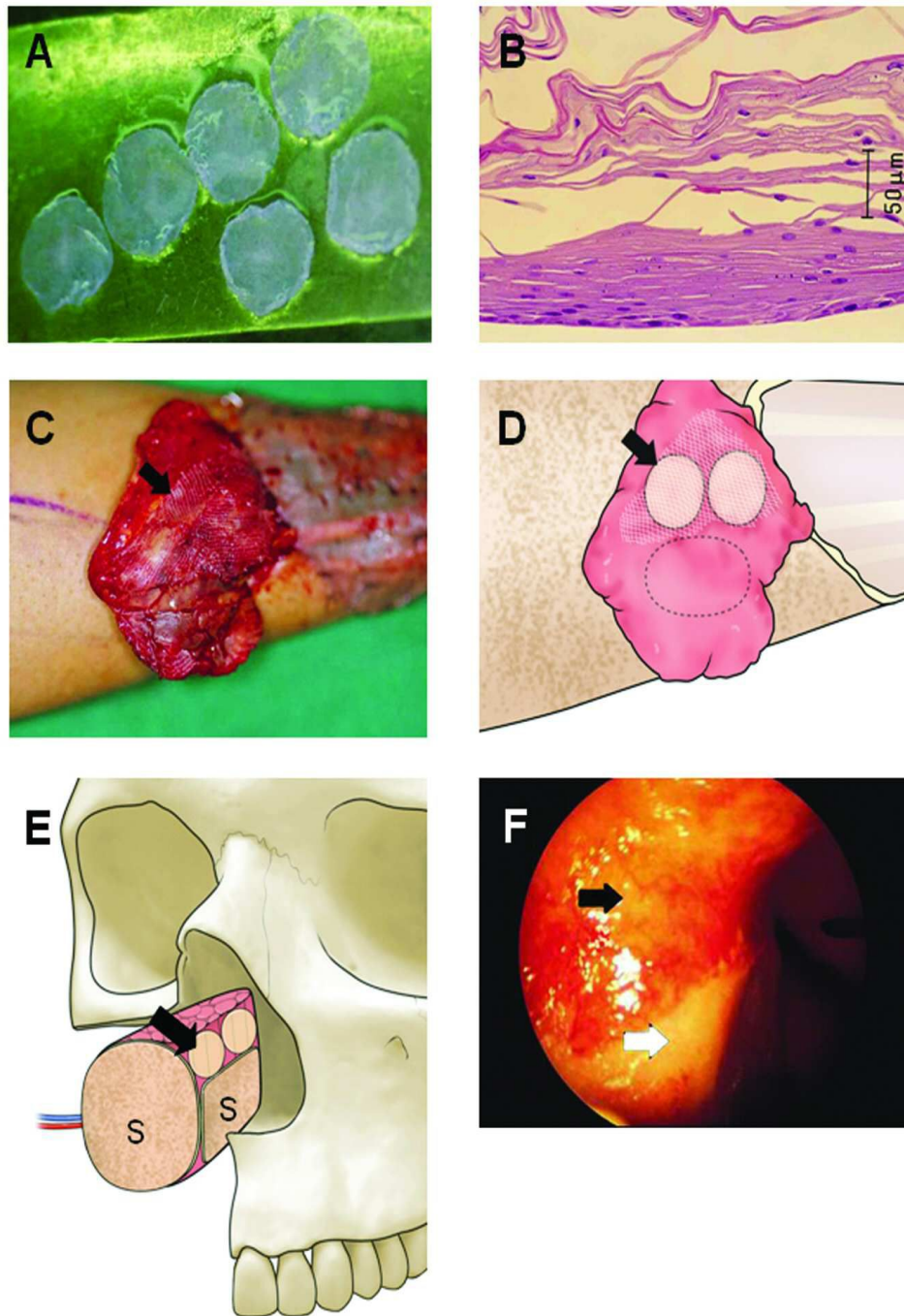
도면1



도면2



도면3



도면4

