



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0142487
(43) 공개일자 2017년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/70 (2006.01) A61K 35/36 (2015.01)
A61L 15/14 (2006.01) A61L 17/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/7007 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0076005

(22) 출원일자 2016년06월17일

심사청구일자 2016년07월12일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

노중렬

서울시 강남구 삼성로 150, 103동 1204호 (대치동, 한보미도아파트)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

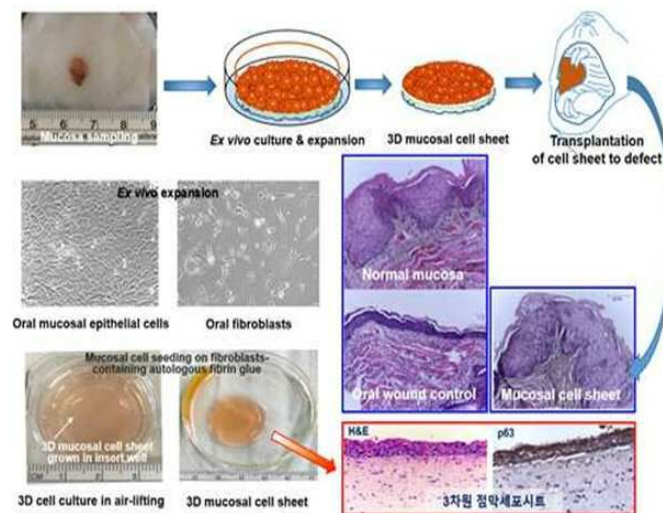
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포시트는 마우스 유래 영양세포(feeder), 특별한 장비 및 특별한 골격체(scaffolds) 없이 제조가 가능하고, 세포 분리제 사용 없이도 간단한 물리적 방법으로 배지로부터 세포시트의 탈착이 매우 용이하고, 결손부의 모양과 크기에 상관없이 이식이 가능하다. 따라서, 본 발명의 세포시트는 재상피화(re-epithelialization)가 요구되는 구강, 인두, 식도 등 수술 후 점막 결손과 궤양 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61L 15/14 (2013.01)
A61L 17/005 (2013.01)
C12N 5/0625 (2013.01)
C12N 5/0632 (2013.01)
C12N 2533/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2920
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 첨단의료기술개발(줄기세포·재생의료 실용화)
 연구과제명 상부기도 소화관 점막 결손 치료를 위한 3차원 점막세포시트 제작과 자가이식 기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2305
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발사업(질병중심 중개기반연구)
 연구과제명 세포시트를 이용한 구강 궤양과 수술 결손부의 효과적 상피화 유도
 기 여 율 1/2
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

섬유세포(submucosal fibroblast)를 포함하는 제 1 세포층; 및
상기 제 1 세포층에 분주된 상피세포를 포함하는 제 2 층을 포함하는 세포시트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 세포층은 상기 섬유세포를 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제와 반응시킨 혼합액을 포함하는 것인, 세포시트.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 상피세포는 각질세포(keratinocyte)인, 세포시트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 상피세포는 구강, 식도, 인두 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상으로부터 유래된 것인, 세포시트.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 섬유세포는 구강, 식도, 인두 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상으로부터 유래된 것인, 세포시트.

청구항 6

1)개체로부터 분리된 피부 또는 점막조직에서 상피층과 상피하조직층을 분리하는 단계;
2)상기 제1)단계에서 분리된 상피층과 상피하조직층을 각각 배양 후, 단일세포화(single cell suspension)하는 단계; 및
3)상기 제2)단계에서 단일세포화된 상피하조직의 섬유세포를 세포 지지체가 포함된 배양접시에 분주한 후, 단일 세포화된 상피층의 상피세포를 상기 섬유세포 위에 분주하여 배양하는 단계;를 포함하는 세포시트의 제조방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 1)단계의 상피층은 점막상피층이며, 상피하조직층은 점막하조직층인 것인, 제조방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 제1)단계의 분리된 피부 또는 점막조직은 피부, 식도, 인두 및 구강 중 선택된 1 종 이상으로부터 분리된 것인, 제조방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 제2)단계의 단일세포화 하는 단계는 트립신을 처리하여 수행된 것인, 제조방법.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 제2)단계의 배양은 영양세포가 포함되지 않고, 혈청이 포함된 MEM(minimum essential medium) 배지에서 5 내지 9일 수행된 것인, 제조방법.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 상기 제2)단계의 단일세포화 단계 이 후, 이차배양하는 것을 더 포함하는, 제조방법.

청구항 12

제 6 항에 있어서, 상기 제3)단계의 세포 지지체가 포함된 배양접시는 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제를 포함하는, 제조방법.

청구항 13

제 6 항에 있어서, 상기 상피세포는 각질세포인 것인, 제조방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 세포시트를 유효성분으로 포함하는, 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체 점막과 피부는 내부 장기와 연부조직을 보호하는 일차 방어벽으로서 생명유지에 가장 중요한 생체 구성물 중 하나이다. 기도와 소화관을 덮고 있는 점막상피의 결손은 초기 감염, 통증 등을 일으킬 수 있으며 원활한 창상 치유가 이루어지지 않을 경우 반흔(scar) 및 협착(adhesion)으로 인한 심각한 기능 장애와 삶의 질 저하로 이어질 수 있다. 혀, 볼 점막, 구개 및 잇몸 등 구강 내 발생한 종양을 수술로 절제한 후, 점막결손부가 발생하고 결손부를 덮기 위해 환자의 다리나 팔에서 얻은 자가 피부 이식을 사용해왔다. 이 경우 피부 공여부의 또 다른 상처를 남길 수 있고 구강 내 결손부에 이식한 피부가 점막과 다르게 치유되는 과정에서 또 다른 문제를 만들 수도 있다. 또한, 항암치료제, 면역억제제나 방사선치료의 독성으로 심한 점막염이 발생하거나 정상 일반인에서도 크고 작은 구강 및 위궤양이 흔히 발생할 수 있다. 궤양의 크기가 크고 반복되거나 쉽게 낫지 않을 경우 심한 통증과 함께 반흔으로 인한 후유증이 발생할 수 있다. 구강 또는 인두 궤양의 치료를 위해 다양한 약물과 치료제가 개발되었으나 효과적인 궤양 치료법이 아직 부족한 실정이다.

[0003] 따라서, 본 발명의 연구자들은 구강 점막결손과 궤양 치료에 있어서, 흉터가 없는 치유(rapid scarless healing)를 위하여 이에 노력한 결과, 환자 유래의 구강점막의 일부를 채취해 약 2주 이내 빠른 시간에 체외에서 점막상피세포와 점막하조직을 포함한 3차원 구강점막 세포시트를 제조함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 출원번호 10-2011-0043298
(특허문헌 0002) 대한민국 출원번호 10-2006-0091301

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법을 제공하기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0006] 섬유세포(submucosal fibroblast)를 포함하는 제 1 세포층; 및

[0007] 상기 제 1 세포층에 분주된 상피세포를 포함하는 제 2 세포층을 포함하는 세포시트를 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상피세포 및 섬유세포는 자가유래의 세포일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제 1 세포층은 상기 섬유세포를 피브린, MEM(minimum essential medium),

혈청, 염 및 혈액 응고제와 반응시킨 혼합액일 수 있다.

- [0010] 상기 염은 NaNO_3 , NaCl , Na_2S , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , KNO_3 , KCl , K_2S , K_2SO_4 , K_2CO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgCl_2 , MgS , MgSO_4 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, BaCl_2 , BaS , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , CaS , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 및 AgNO_3 일 수 있고, 바람직하게는 염화칼슘(CaCl_2)일 수 있다.
- [0011] 상기 "혈액 응고제"는 혈액 응고를 개시 또는 증강시키거나 피브린용해 또는 혈전증을 저해하는 능력이 있는 약제를 지칭한다. 상기 혈액응고제는 트레넥사민산(tranexamic acid), 호모코아굴라제(homocoagulase), 트롬빈 파우더(thrombin powder), 혈장 유래 인자 VII/VIIa, IX/IXa, X/Xa, II/IIa, VIII/VIIIa, V/Va, 재조합 인자 VII/VIIa(재조합 인간 인자 VIIa (NovoSeven, eptacog alfa (활성화된), ATC code B02BD08)), IX/IXa, X/Xa, II/IIa, VIII/VIIIa, V/Va 및 그의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 혈액 응고제의 예에는 흡착성 화합물, 지혈제, 트롬빈, 피브린 글루, 테스모프레신 (상표명: DDAVP, Stimite, Minirin) 및 동결 혈장, 응고 인자 농축물, 활성화된 또는 비활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물, 웨이바 Vh, 혈소판 농축물 및 그의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 혈액 응고제의 부가적인 예에는 트롬빈-활성화 가능 피브린용해 저해제 (TAFI), 단백질 C 저해제(PCI), 단백질 S 저해제(PSI), 아미노카프론산, 아프로티닌 및 그의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 이용가능한 혈액 응고 인자의 더 많은 예는 인용문헌 Brooker M, Registry of Clotting Factor Concentrates, Eighth Edition, World Federation of Hemophilia, 2008 에서 찾을 수 있다.
- [0012] 본원 발명에서 혈액 응고제는 트레넥사민산(tranexamic acid), 호모코아굴라제(homocoagulase) 또는 트롬빈 파우더(thrombin powder)일 수 있고, 바람직하게는 트레넥사민산일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 각질세포(keratinocyte)일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 구강, 인두, 식도 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 섬유세포는 구강, 인두, 식도 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 상피층에서 단일세포화된 세포일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 섬유세포는 점막하조직 또는 상피하조직층으로부터 분리되어, 단일세포화되어 배양된 세포일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 상기 세포시트의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 제조방법은 1)개체로부터 분리된 피부 또는 점막조직에서 상피층과 상피하조직층을 분리하는 단계;
- [0020] 2)상기 제1)단계에서 분리된 상피층과 상피하조직을 각각 배양 후, 단일세포화(single cell suspension)하는 단계; 및
- [0021] 3)상기 제2)단계에서 단일세포화된 상피하조직의 섬유세포를 세포 지지체가 포함된 배양접시에 분주한 후, 단일세포화된 상피층의 상피세포를 상기 섬유세포 위에 분주하여 배양하는 단계;를 포함한다.
- [0022] 상기 세포 지지체는 체내 환경과 유사하여 다양한 세포의 부착, 증식, 분화 및 배양을 할 수 있는 환경을 제공할 수 있다. 상기 세포 지지체는 배양접시, 샤알레, 8 내지 98웰 배양접시, 셀테스크 LF(SUMILON), 세포 인서트(cell insert), 멀티플레이트 및 플라스크 등을 포함할 수 있지만 이에 제한 되지 않는다. 또한, 세포 지지체의 재질로는 유리, 개질유리, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트 또는 세라믹류일 수 있다.
- [0023] 바람직하게는, 세포 지지체는 세포 인서트(cell insert; insert well)일 수 있고, 상기 세포 인서트를 이용하는 경우, 세포시트의 탈부착이 용이하다. 또한, 세포 인서트(insert well) 사용시 공기부양(air lifting)을 위한 특별한 장비와 조건 없이도 배양이 가능하고, 자가유래 혈장과 섬유아세포를 지지체로 사용해 상피세포의 성장을 촉진하고 특이한 온도반응접시(Okano 등), 무세포진피(acellular dermis), 콜라겐 아교(collagen glue), 양막(amniotic membrane) 등의 특별한 골격체(scaffolds) 없이 쉽고 편리하고 저렴하게 세포시트 제조가 가능하다.
- [0024] 먼저, 제1)단계의 분리된 점막조직 또는 피부조직은 피부, 식도, 인두 및 구강 중 선택된 1 종 이상으로부터 분리될 수 있고, 크기가 $1 \times 1\text{mm}$ 내지 $10 \times 10\text{mm}$, 바람직하게 $5 \times 5\text{mm}$ (0.2cm^2)일 수 있다. 상기 개체는 상처 또는 궤

양을 갖은 환자일 수 있다. 상기 상피층과 상피하조직의 분리를 위하여, 어떠한 방법으로도 가능하나, 핀셋 또는 나이프 등을 이용한 물리적 방법을 이용할 수 있다. 상기 상피층과 상피하조직층을 분리하기 전에 인산완충액(PBS; phosphate buffered solution)으로, 바람직하게는 10회 이상을 세정할 수 있고, 이 후, 트립신 EDTA로 처리하여, 30 내지 40℃, 10분 내지 1시간동안 방치할 수 있다.

[0025] 상기 제2)단계는 단일세포화하는 단계로, 상기 1)단계에서 분리된 상피층 및 상피하조직을 따로 MEM(minimum essential medium)에서 배양한 후, 인산완충액으로 세정 후, 0.1 내지 1%, 바람직하게는 0.25%의 트립신용액을 이용하여, 30 내지 40에서 5분 내지 30분간 단일세포화할 수 있다.

[0026] 상기 제2)단계의 배양은, 혈청을 포함한 MEM 배지를 이용할 수 있고, 바람직하게는 5 내지 9일 동안 배양할 수 있다. 상기, 혈청은 환자유래 혈청일 수 있고, 열불활성화시킨 혈청일 수 있고, 농도는 1 내지 20%, 바람직하게는 10% 일 수 있다. 또한, 제2)단계의 단일세포화 과정을 거친 후, 이차배양을 추가적으로 수행할 수 있다.

[0027] 상기 제3)단계는 세포시트를 제조하는 단계로, 2)단계에서 단일세포화한 상피세포를 인서트가 포함된 배양접시에 분주한 후, 섬유세포 위에 분주할 수 있다. 상기 제3)단계의 세포지지체가 포함된 배양접시는 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제를 포함될 수 있으며, 상기 물질들은 섬유세포와 혼합되어 굳을 수 있다. 상기 섬유세포의 분주는 2.5×10^3 내지 2.5×10^5 , 바람직하게는 2.5×10^4 개로 분주할 수 있다. 상기 상피세포의 분주는 1×10^5 내지 1×10^7 , 바람직하게는 1×10^6 개를 분주할 수 있다. 상기 3)단계의 과정은 공기부양법을 통하여 수행될 수 있다. 또한, 상기 상피세포는 각질세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0028] 또한, 본 발명은 본 발명의 세포시트를 유효성분으로 포함하는, 상처 또는 궤양 치료용 세포치료제를 제공한다.

[0029] 본 발명의 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0030] 바람직하게는 본 발명의 세포치료제는 상처 또는 궤양 등에 대한 치료용으로 이용될 수 있다. 본 발명의 세포시트를 상처가 난 부위, 또는 궤양이 발생한 부위에 투여함으로써, 상처 또는 궤양을 치료할 수 있다. 본 발명의 세포치료제의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 세포시트는 마우스 유래 영양세포(feeder)를 사용하지 않았고, 소, 마우스 등 이종유래 배양촉진제 없이 환자 유래 혈청을 포함한 영양제 등을 사용해 2주 이내 인체 구강점막과 흡사한 3차원적 구강점막 세포시트의 제조가 가능하다.

[0032] 또한, 인서트(insert well) 사용시 공기부양(air lifting)을 위한 특별한 장비와 조건 없이도 배양이 가능하고, 자가유래 혈장과 섬유아세포를 지지체로 사용해 상피세포의 성장을 촉진하고 특이한 온도반응접시(Okano 등), 무세포진피(acellular dermis), 콜라겐 아교(collagen glue), 양막(amniotic membrane) 등의 특별한 골격체(scaffolds) 없이 쉽고 편리하고 저렴하게 세포시트 제조가 가능하다.

[0033] 또한, 배지에 자란 구강점막 세포시트를 트립신과 같은 세포 분리제 사용 없이도 간단한 물리적 방법으로 배지로부터 세포시트의 탈착이 매우 용이하다.

[0034] 또한, 본 발명의 세포시트는 잘 찢겨지지 않으면서도 신축성이 뛰어나며 점막결손부 변연 4 내지 5군데 정상 점막에 세포시트 끝을 봉합해 결손부의 모양과 크기에 상관없이 사용이 용이하다.

[0035] 또한, 본 발명의 세포시트는 연령, 나이, 환자의 지병의 상태에 관계없이, 대부분의 환자 구강점막 일부를 채취하여, 2주 이내 10 cm^2 이상 크기로 배양이 가능하고, 신축성이 매우 뛰어나 약 30 cm^2 크기로 점막결손부에 늘려서 이식이 가능하다.

[0036] 따라서, 본 발명의 세포시트는 재상피화(re-epithelialization)가 요구되는 구강, 인두, 식도 등 수술 후 점막

결손과 케양 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 구강 점막조직을 채취한 사진을 나타낸 도이다.

도 2는 일차배양된 구강점막 상피각질세포(A)와 섬유아세포(B)의 독립현미경 사진(200배)을 나타낸 도이다.

도 3은 인서트 안에 배양된 구강점막 세포시트(A)와 물리적으로 떼어낸 세포시트(B)의 사진을 나타낸 도이다.

도 4는 체외 배양된 3차원 구조의 구강점막 세포시트를 헤마톡실린에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색한 사진(A), 싸이토케라틴 AE1/AE3(Dako, Tokyo, Japan)을 이용해 면역조직화학염색한 사진(B) 및 인간 줄기세포마커인 p63에 염색한 사진(C)을 나타낸 도이다.

도 5는 구강점막조직으로부터 제작된 3차원 세포시트와 구강점막조직에서 면역형광염색을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 3차원 세포시트의 제조과정을 나타낸 도이다

도 7은 일차배양된 구강점막(oral mucosa)와 피부 상피각질세포(skin epithelium)에서 날짜별 독립현미경 사진(x100배)을 나타낸 도이다(화살표는 세포성장 변연을 나타냄).

도 8은 구강점막(oral mucosa)과 피부(skin) 조직을 채취해 체외에서 일차배양 후 증식된 세포수(cell number, A)와 세포 생존율(cell viability, B)을 나타낸 도이다(조직 채취 후, 각 일자별로 트리판블루 세포 염색을 이용하여 세포수와 생존율의 평균과 표준편차를 나타냄).

도 9는 구강점막(oral mucosa), 피부(skin), 식도점막(esophageal mucosa)과 인두점막(pharyngeal mucosa)에서 조직을 채취해 체외에서 일차배양 9일 후 독립현미경 사진(x100배)을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 세포시트의 조직학적 소견과 정상조직의 조직학적 소견을 비교한 도이다.

도 11은 구강, 피부, 식도 및 인두에서 채취한 조직의 일차 배양 후, 클론형성능을 비교한 도이다(각각의 조직을 채취한 후, 1차 배양하고, 피브린이 덮인 배지에 각각 같은 수의 세포를 뿌린 후, 약 14일 후 형성된 클론의 개수를 비교하였음; 피부린을 이용하지 않은 점막세포를 대조군으로 함).

도 12는 본 발명의 3차원 세포시트의 처리와 탈착의 용이성을 나타낸 도이다(A: 인서트를 포함한 세포 배양접시에 담겨있는 3차원 세포시트의 육안 사진; B:인서트를 꺼내 핀셋등을 이용하여 세포시트를 배지 접촉면으로부터 가볍게 떼고 생리식염수가 담긴 배양접시에 옮기는 과정을 나타낸 사진; 좌로부터 우로 탈착과 이동과정을 나타냄).

도 13은 동물실험을 위한 3차원 세포시트의 준비 과정을 나타낸 도이다(3차원 세포시트와 실라스틱 시트를 알맞은 크기로 자르고 덮어(화살표) 창상에 이동하기 전 준비과정을 찍은 사진(좌로부터 우로 과정을 설명)).

도 14는 마우스 구강 창상모델에 3차원 점막세포시트를 적용하는 방법을 나타낸 도이다(A: 마우스 구강 불점막에 전층 창상(full-thickness wound)를 만듦; B: 3차원 세포시트와 실라스틱 시트를 창상에 덮음).

도 15는 마우스 구강 창상모델에 점막세포시트 이식의 창상치유 효과를 나타내는 조직학적 소견 결과이다(A:대조군; B:정상 구강점막 조직; C:세포시트를 덮은 실험군)

도 16은 구강 창상모델에 점막세포시트 이식의 창상치유 효과를 나타낸 도이다(A:image J 프로그램; B:점막상피 두께; C: 점막하조직의 두께; D:콜라겐 밀도)

도 17은 랫트 구강 창상모델에서 점막세포시트의 창상치유 효과에 대한 실험 개요를 나타낸 도이다(A:제작된 3차원 세포시트를 떼어 적당한 크기로 잘라 실라스틱 시트 위에 얻는 단계; B:흰쥐 불점막에 전층 창상을 만든 후, 세포시트를 창상(화살표)에 부착하는 단계; C:창상을 만들지 않은 정상 불점막(좌측)과 구강점막 창상 후, 4주째 창상군의 불점막(중간)과 창상에 세포시트를 덮었던 실험군의 불점막(우측)의 사진).

도 18은 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과를 나타낸 도이다.

도 19는 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과에 대한 조직학적 분석 결과를 나타낸 도이다(A:정상 피부조직; B:창상 피부 조직 C:세포시트를 덮은 피부조직; D, E: 상피와 상피하 조직의 두께를 나타냄(Image J)).

도 20은 3차원 세포시트의 종양형성 등 부작용을 관찰한 결과이다(A:3차원 세포시트를 nude마우스 피하에 이식; B: 4주 후, 이식한 부위를 열어 육안적 및 현미경적 관찰)

도 21는 nude마우스(athymic nude mice)의 정상 볼점막 조직(A), 점막상피와 상피하 조직을 제거하고 체외 배양된 3차원 구강점막 세포시트를 이식한 군(실험군, C) 및 이식하지 않은 대조군(B)의 헤마톡실린에오신 염색한 사진을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] 구강 점막세포를 이용한 세포시트의 제조

1. 구강 점막세포의 채취와 체외배양

1.1 구강 점막조직의 채취

의사의 충분한 설명에 동의서(informed consent)에 서명한 후, 외래나 수술실에서 구강 내에서 점막 상피세포(mucosal epithelial cells) 및 점막하조직(submucosa)이 포함된 55mm (0.2 cm²) 크기의 구강점막을 채취하였다. 이와 함께 10mL 환자 혈액을 구연산나트륨(sodium citrate)이 들어있는 진공채혈기(vacutainer tube, 혈장으로 사용)와 구연산나트륨이 없는 채혈기(혈청으로 사용)에 각각 담았다. 구강점막 채취를 위한 과정 모두 청결하게 수행하였으며, 포비돈 요오드액을 이용하여 소독을 하였고, 생리식염수로 반복 세척하여 오염을 방지한 후, 실험실로 채취한 조직을 운반하였다.

상기 채취한, 구강점막의 사진을 도 1에 나타내었다.

1.2 구강 점막조직의 처리

실험실로 구강점막조직을 운반한 후, 처리하는 과정은 1)세정, 2)점막상피층과 점막하조직층의 분리, 3)일차배양의 순서로 진행하였다. 보다 구체적으로, 채취한 구강점막을 인산완충액(Dubecco's phosphate buffered solution, PBS; Life TechnologyTM, Carlsbad, CA, USA)으로 10회 이상 세정하였다. 점막조직을 트립신(trypsin) EDTA (Life TechnologyTM)으로 처리하여 37℃에서 20 내지 30분 동안 방치하였다. 핀셋과 칼을 사용하여 점막상피층과 점막하조직을 따로 분리하였다. 점막상피층은 상피세포 배양을 위해서, 점막하 조직은 섬유아세포의 배양을 위해서 사용하였다. 점막층은 MEM(minimum essential medium; Life TechnologiesTM)에 배양 후, 인산완충액으로 세정하였다. 점막층(점막상피층)과 점막하조직층을 각각 따로 0.25% 트립신 용액(Life TechnologiesTM)에 넣고 37에서 10분간 처리하여 단일세포화(single cell suspension)하였다.

1.3 구강점막세포의 체외배양

영양세포(feeder cells)가 포함되지 않은 배지에 50℃ 수조에서 약 30분간 열불활성화시킨 10%의 환자유래 혈청(patient-derived heat inactivated serum)을 포함한 MEM 배지에 점막상피세포와 점막하조직을 각각 따로 뿌려 37℃에서 분리 배양하였다. 배양액을 3일에 한번 씩 교체하였고, 세포밀도(cell confluence)가 약 70 내지 80% 정도가 되는 시점에서 배양된 세포를 트립신을 이용해 단일 세포화하고 다른 배지에서 이차 배양하였다. 채취한 혈액은 3700rpm에서 8분간 원심분리한 후, 상층액인 혈장(plasma)만 따로 분리해서 -80℃의 초저온냉동고(deep freezer)에 보관하였다. 상기 세포의 성장형태를 도립현미경으로 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다.

도 2에 나타난 바와 같이, 채취한 점막 상피세포로부터 약 1주일 후 약 백 만개(1x10⁶) 이상의 점막세포 배양이 가능함을 확인하였다.

2. 구강점막 3차원적 체외배양을 통한 점막세포시트의 제작

구강점막 조직을 채취하여 약 1주일 실험실에서 일차 배양한 구강점막 상피각질세포(keratinocyte) 및 점막하 섬유세포(submucosal fibroblast)를 트립신 및 트립신 EDTA (Life TechnologiesTM)를 사용해 배지에서 분리하

여 각질세포(keratinocyte) 1×10^6 개, 섬유세포 2.5×10^4 개를 각각 준비하였다. 코닝 트랜스웰 24mm 폴리에스테르 멤브레인 인서트(BD Bioscience, Franklin Lake, NJ, USA)를 이용해 6웰 접시(well plate)에 인서트를 끼웠다. 환자의 혈장에서 채취한 피브린(fibrin) 1mL에 섬유아세포를 Eagle's MEM (Life TechnologiesTM), 10% 환자 유래 혈청과 2.5×10^4 개 섬유세포(submucosal fibroblasts)를 섞었다. 여기에 0.167 mL 1% 칼슘 클로라이드(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), 20L 트렉사민산(tranexamic acid, Sigma-Aldrich)을 섞어 인서트에 뿌리고, 37°C, 5% CO₂를 함유한 인큐베이터 안에서 배양하였다. 10분 후, 인서트에 넣은 혈장 혼합액이 굳으면 그 위에 1×10^6 개 점막 상피세포를 뿌렸다. 상피세포층이 약간 잠길 정도로 인서트 밖 배양접시 안에 위에서 설명한 세포배양 배지를 넣어 공기부양법(air-lifting)으로 배양하였다.

[0051] 이의 결과를 도 3에 나타내었다. 또한, 체외 배양된 3차원 구조의 구강점막 세포시트를 헤마톡실린에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색한 사진(A), 싸이토케라틴 AE1/AE3(Dako, Tokyo, Japan)을 이용해 면역조직화학염색한 사진(B) 및 인간 상피세포마커인 AE1/AE3와 줄기세포마커인 p63에 염색한 사진(C)을 도 4에 나타내었다.

[0052] 또한, 구강점막조직으로부터 제작된 3차원 점막세포시트와 정상 구강점막조직에서 면역형광염색을 비교한 결과를 도 5에 나타내었다(미분화각질세포(cytokeratin 5/6), 분화각질세포(cytokeratin AE1/AE3), 세포증식(ki67), 상피줄기세포(p64) 및 중엽세포(vimentin)마커들에 대한 면역형광염색, 세포 염색은 DAPI 사용)

[0053] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 구강점막 유래 각질세포의 분화가 유도되었고 약 1주일 후 점막상피세포의 밀도가 90 내지 100%인 구강점막 세포시트를 얻을 수 있었다. 구강점막 조직을 채취해서 체외에서 약 2주 이내 인체 구강점막과 흡사한 3차원 구강점막 세포시트 제작이 가능하였고, 정상 구강점막 조직과 특성이 유사함을 확인하였다.

[0054] [실시예 2] 피부, 식도 점막 및 인두 점막을 이용한 세포시트 제작

[0055] 1. 피부, 식도 점막 및 인두 점막을 이용한 3차원 세포시트 제작

[0056] 실시예 1과 동일한 방식으로, 피부, 식도 및 인두 조직을 이용하여 3차원 세포시트를 제조하였다.

[0057] 2. 3차원 세포시트의 특성 분석

[0058] (1)피부 상피각질세포(skin epithelium)를 일차배양하였고, 일차배양된 구강점막(oral mucosa)과 피부 상피각질세포의 날짜별 도립현미경 사진(x100배)을 도 7에 나타내었고, 구강점막(oral mucosa)과 피부 조직을 채취해 체외에서 일차배양 후, 증식된 세포수와 세포 생존률을 도 8에 나타내었다.

[0059] (2)또한, 구강점막, 피부, 식도점막 및 인두점막에서 조직을 채취하여, 체외에서 일차배양 9일 후, 도립현미경 사진(x100배)을 도 9에 나타내었다.

[0060] (3)또한, 실시예 1과 동일한 방식으로 제조한 각 조직을 이용한 세포시트의 조직학적 소견과 정상조직의 조직학적 소견을 비교한 결과를 도 10(헤마토실린-에오신 염색 사진)에 나타내었다.

[0061] (4)또한, 구강점막, 피부, 식도 및 인두에서 조직을 채취한 후, 1차 배양하고 피브린이 덮인 배지에 각각 같은 수의 세포를 뿌린 후, 약 14일 후 형성된 클론의 개수를 비교하였고, 피부린을 덮지 않은 배지에 뿌린 점막세포를 대조군으로 삼았다. 상기 구강, 피부, 식도 및 인두에서 채취한 조직의 일차배양 후 클론 형성능을 도 11에 나타내었다.

[0062] (5)제작된 3차원 세포시트의 처리와 탈착의 용이성을 확인하여, 이를 도 12(A:인서트를 포함한 세포 배양접시에 담겨있는 3차원 세포시트 육안 사진; B:인서트를 꺼내 핀셋 등을 이용하여 세포시트를 배지 접촉면으로부터 가볍게 떼고 생리식염수가 담긴 배양접시에 옮기는 과정을 찍은 사진; 좌로부터 우로 탈착과 이동과정을 나타냄)에 나타내었다. 상기의 결과, 채취 후 약 2주 내 완성된 구강점막 세포시트를 핀셋을 이용해 인서트의 변연으로부터 가볍게 물리적으로 탈착할 수 있었다.

[0063]

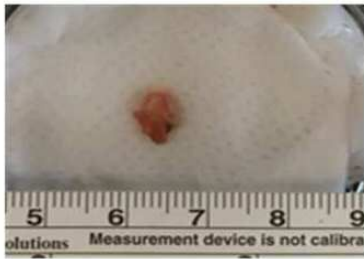
[0064] [실시예 3] 본 발명에서 제조한 세포시트의 이식

[0065] 1. 마우스 구강 창상 모델에서 세포시트의 이식 확인.

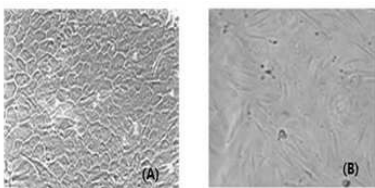
- [0066] 동물실험을 위한 3차원 세포시트(구강점막을 이용한 세포시트)의 준비하였고(도 13 참조), 이 후, 마우스 구강 창상모델에 세포시트를 적용하였다(도 14 참조). 또한, 구강 창상 모델에서 치료효과를 확인하였다(도 17 참조).
- [0067] 창상 후, 4주째 되는 실험동물을 희생하고, 창상부를 수거해 헤마토실린-에오신 염색 후, 관찰한 결과를 도 15에 나타내었다. 또한, 창상 후, 4주째 수거한 구강점막 조직에서 Image J 프로그램(A)을 이용하여, 점막상피 두께(B), 점막하조직의 두께(C)와 콜라겐 밀도(콜라겐 밀도는 마손-트리크론(masson-trichrome) 염색 후 상대적인 콜라겐 밀도 조사함)를 창상을 주지 않는 정상 점막조직, 창상 점막, 창상에 세포시트를 적용한 군을 비교하였고, 이의 결과를 도 16에 나타내었다.
- [0068] 도 15에 나타난 바와 같이, 세포시트를 사용하지 않은 대조군(A)에 비하여, 세포시트를 덮은 실험군(B)에서 구강점막 상피층의 두께가 구강점막조직(C)와 유사하게 회복됨을 확인하였다.
- [0069] 도 16에 나타난 바와 같이, 점막하조직 및 점막상피의 두께는 창상 점막에 비하여 증가하였고, 콜라겐 밀도는 감소함을 확인하였다.
- [0070] 상기의 결과를 종합하면, 창상군에서 정상 불점막과 같은 재상피화가 이루어졌으나, 점막이 얇게 형성되고 반흔(scar)이 남았다. 이에 반해, 세포시트를 사용한 실험군의 경우, 정상 불점막과 비슷한 재상피화가 형성됨을 확인하였다.
- [0071] **2. 마우스 피부 창상모델에서 세포시트 이식 확인**
- [0072] 실시예 3-1과 같은 방식으로(피부조직을 이용하여 제조된 세포시트 이용), 마우스 피부 창상모델에 본 발명의 세포시트를 이식하였다. 구체적으로, 누드마우스와 랫트 모델에서 각각 약 2cm 크기의 피부 전층(full thickness) 창상모델을 만들고, 3차원 세포시트를 덮고, 3차원 세포시트를 덮지 않은 대조군과 창상 치유 효과를 비교하였다.
- [0073] 이의 결과를 도 18에 나타내었다. 또한, 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과를 조직학적으로 분석한 결과를 도 19에 나타내었다.
- [0074] 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, 생쥐 정상 피부조직(도 19의 A)에 비하여 창상부 피부 상피(도 19의 B)가 얇고, 세포시트를 덮은 군에서 정상조직과 비슷한 창상 치유가 관찰됨을 확인하였다. 또한, 상피와 상피하 조직의 두께(도 19의 D, E)를 image J 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 정상 피부조직과 세포시트를 덮은 군에서 비슷한 창상 치유효과를 확인하였다.
- [0075] **3. 세포시트 이식의 부작용 확인**
- [0076] 3차원 세포시트의 이식이 종양형성 등 부작용을 확인하기 위하여, 본 발명의 3차원 세포시트를 누드마우스의 피부에 이식하고, 4주 후 이식한 부위를 열어 육안적 및 현미경적 관찰하여, 종양형성등의 부작용을 확인하였다.
- [0077] 이의 결과를 도 20에 나타내었다.
- [0078] 도 20에 나타난 바와 같이, 종양형성등의 부작용이 없음을 확인하였다.
- [0079] **4. 누드마우스에 구강점막을 이용하여 제조된 세포시트를 이식**
- [0080] 실시예 1 또는 2에서 제조된 세포시트를 2mL 배양액이 포함된 배양 접시에 옮기고 이식이 필요한 수술실로 이동하였다. 세포시트의 끝을 두 개의 핀셋을 이용하여 가볍게 잡아 누드마우스의 점막결손부에 덮었다. 이의 결과를 도 21에 나타내었다.
- [0081] 도 21에 나타난 바와 같이, 제작된 점막 세포시트가 잘 찢겨지지 않으면서도 신축성이 뛰어나고, 실제로 점막결손부의 크기가 30cm² 까지 모양과 크기에 상관없이 점막결손부 변연부 정상 점막 4 내지 5군데에 세포시트 끝을 봉합해 사용이 용이함을 확인하였고, 창상 회복을 매일 관찰한 결과, 생체 결손부에 이식한 자가이식 구강점막 세포시트가 감염, 분리됨 없이 잘 안착되어 결손부 창상의 원활한 재상피화가 관찰됨을 확인하였다.

도면

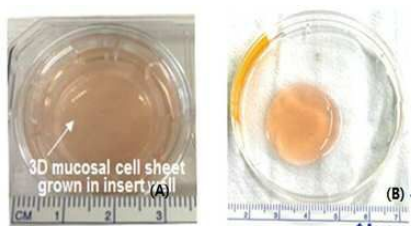
도면1



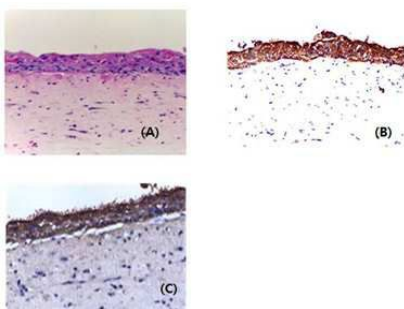
도면2



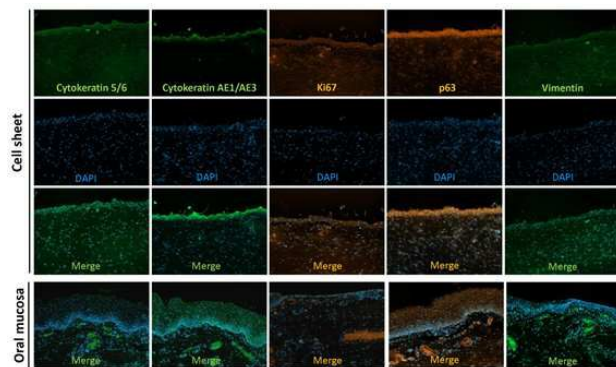
도면3



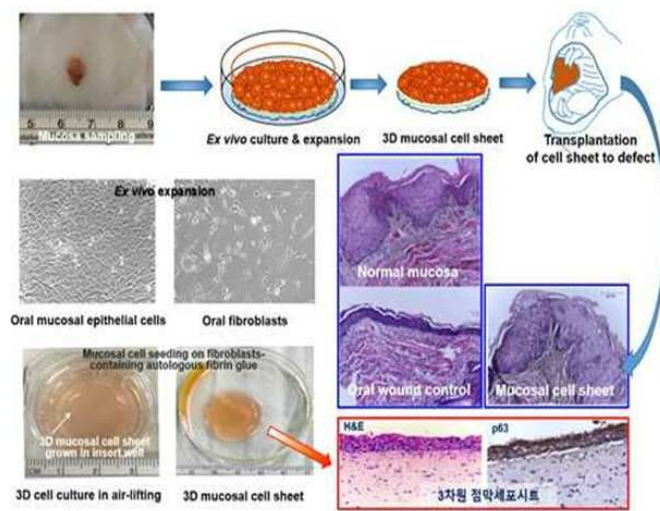
도면4



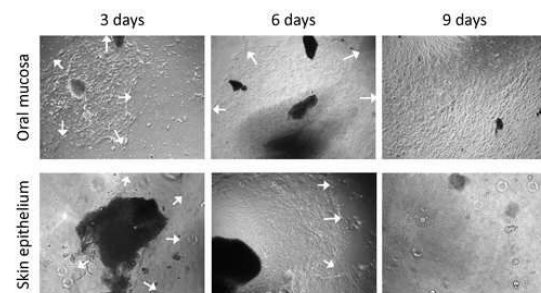
도면5



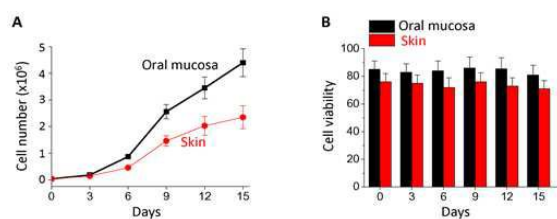
도면6



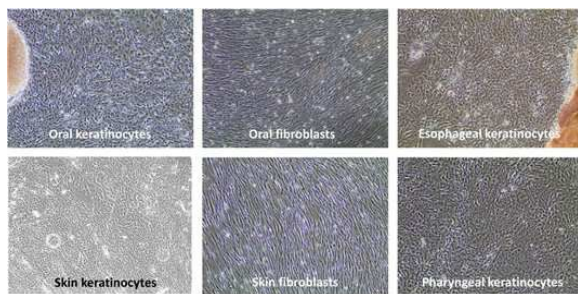
도면7



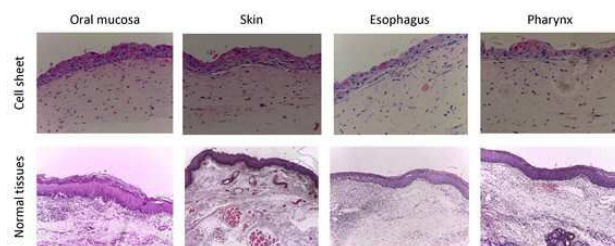
도면8



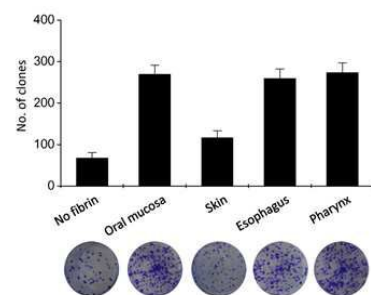
도면9



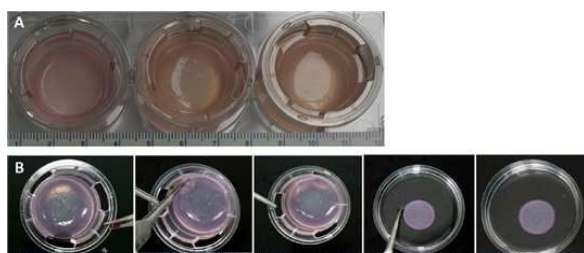
도면10



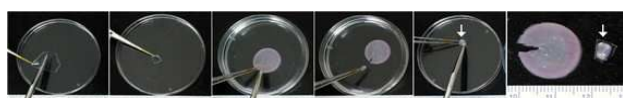
도면11



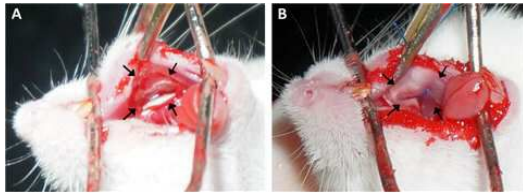
도면12



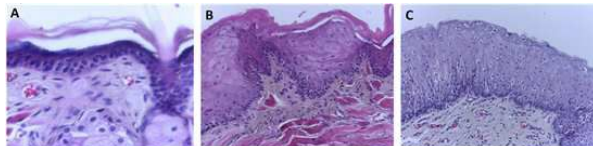
도면13



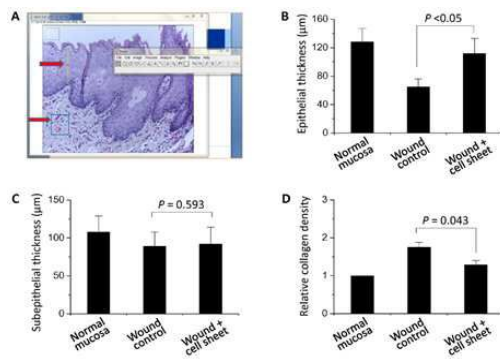
도면14



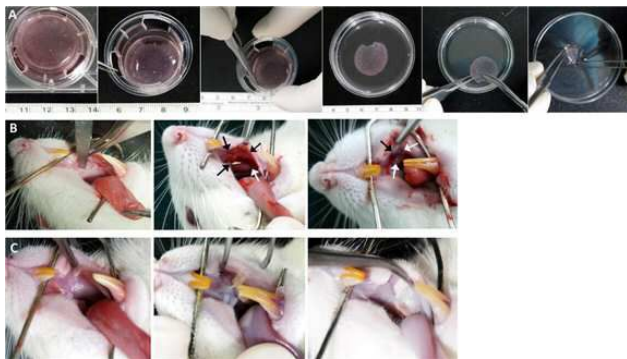
도면15



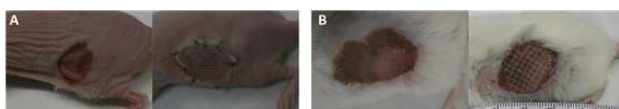
도면16



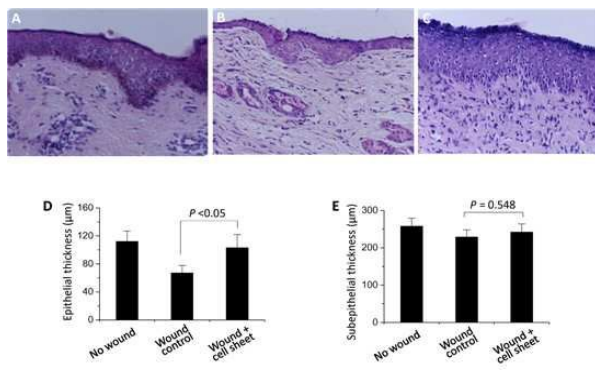
도면17



도면18



도면19



도면20



도면21

