

성대 반흔에 대한 조직공학적 치료

부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실

이 병 주

Tissue Engineering for Treatment of Vocal Fold Scar

Byung-Joo Lee, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

— ABSTRACT —

Laryngologists frequently are confronted with patients who have remained or become dysphonia after laryngeal surgery or trauma. One of major these reason is vocal fold scar. Although behavioral, pharmacological, and surgical intervention have been offered in an attempt to improve or regenerate scarred vocal fold mucosa, the ideal treatment for vocal fold scar has not yet been found. Several tissue engineering technique for vocal fold scar have recently been described in tissue culture and animal model. Cell types for tissue engineering of vocal fold scar have been native or scarred vocal fold fibroblast, autologous fibroblast from nonlaryngeal tissue, adult mesenchymal stem cells. Decellularized organ matrix, biologic polymers, synthetic biomimetic hydrogels, and synthetic polymers have used as scaffold. The chemical and mechanical stimulation, such as hepatic growth factor and vibration stress, have been described for the effect of the maturation of implanted cells. Multiple tissue engineering approaches hold promise for reproducing functional vocal fold tissue. (J Clinical Otolaryngol 2010;21:191-198)

KEY WORDS : Vocal fold scar · Tissue engineering · Fibroblast · Mesenchymal stem cells · Hyaluronic acid.

서 론

음성장애는 일상생활에서 흔히 접할 수 있는 질환 중의 하나이다. 많은 음성장애에 연관된 질환은 음성 치료나 수술로 인해 많은 호전을 보이고 있으나, 아직 성대 반흔(vocal fold scar)에 대한 치료 성적은 아직 만족스럽지 않다. 성대 반흔은 과도한 음성 사용이나 오용, 감염, 방사선 조사, 수술이나 기관 삽관 등에 의한 점막 손상 등에 의해 발생할 수 있다. 성대 반흔에 의해 성대

점막의 생체역학(biomechanical) 특성이 변화하게 된다. 이러한 변화는 발생시 성대가 비정상적인 진동을 하게하여 결국 심한 발성장애를 유발하게 된다. 음성장애는 개인의 삶의 교류와 사회생활에도 영향을 주게 되어 삶의 질 또한 저하된다.

일반적으로 조직 공학(tissue engineering)이란 손상된 조직을 재생하거나 대체하기 위해 살아있는 세포를 조작하는 기술을 말한다. 최근 이러한 조직 공학 기술을 이용하여 성대 반흔을 치료하고자 하는 여러 가지 연구가 진행되고 있다. 조직 공학에서는 3가지의 기본 요소, 즉 세포, scaffold, 성장 유도 인자가 있다. 조직 공학을 포함하는 광범위한 의미로 재생의학(regenerative medicine)이 사용되는데, 재생의학은 세포 요소를 제

교신저자 : 이병주, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10
부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실
전화 : (051) 240-7335 · 전송 : (051) 246-8668
E-mail : voicelee@pusan.ac.kr

외한 scaffold나 성장 유도 인자를 이용하여 손상된 조직을 재생하거나 치료하고자 하는 것이다. 성대 상처 치유과정과 성대 반흔의 일반적인 특징과 현재 치료에 대해 먼저 기술한 후 성대 반흔에 대한 여러 조직 공학 연구에서 사용하거나 적용되고 있는 세포, scaffold, 성장 유도 인자 등의 3가지 요소에 대해 기술하고자 한다.

본 론

성대의 상처 치유

성대의 정상적인 상처 치유의 과정인 염증기(inflammation), 증식기(proliferation), 성숙기(maturation)의 3가지 단계를 거친다.¹⁾ 성대가 손상을 받으면, 지혈, 염증, 재생피화(re-epithelization) 과정이 바로 시작된다. 성대 손상 후 일반적으로 24시간 이내에 완전한 지혈이 이루어지고, 염증은 4~7일 지속되고, 재생피화는 6일경 이루어진다. 재생피화는 쥐에서는 손상 후 1일에서 3일 사이에 시작하는 것이 관찰되며, 토끼에서는 5일, 개는 7일에 완전하게 일어난다. 증식기는 손상 후 2일에서 4일 사이에 시작한다. 여러 조직으로 분화가 가능한 중배엽 기원의 세포의 증식과 혈관 증식이 손상 받은 후 2일에 시작한다. 토끼와 쥐에서 섬유아세포의 증식의 peak는 손상 후 3일이다. 여러 가지 단백질과 proteoglycan의 합성, 상처 수축과 세포외기질의 변화는 손상 후 3일에 시작한다. 단백질과 proteoglycan의 합성은 손상 후 2달까지 지속되기도 한다.¹⁾

성대 반흔의 특징

성대 반흔이 발생 장애를 유발하게 되는 이유는 1. 성대 고유층에 증가된 그리고 비정상적인 구조의 collagen, 2. 중요한 성대 점막의 세포외기질의 감소, 3. 성대 점막의 부피 감소, 4. 성대의 유연성이 감소, 5. 성문 폐쇄 부전 등이다.²⁾ 성대 반흔에서 가장 중요한 부분은 세포외기질의 성분 변화이고, 이러한 세포외기질 성분 변화의 기전과 섬유화 기전 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 성대 반흔에 대한 많은 연구는 인간의 성대를 대상으로 한 연구는 매우 제한적으로 있고, 쥐, 토끼, 개 등의 동물 성대를 대상으로 한 많은 연구가 있다.³⁾

성대 고유층의 점탄성을 유지하기 위해서는 세포외

기질의 조성이 중요하다. 이중 가장 중요한 성분 중의 하나가 collagen이다. 성대 반흔은 일반적으로 성대 고유층에 collagen이 매우 증가하고 증가한 collagen이 비정상적인 구조로 구성되어 성대 점탄성 감소시켜서 성대의 진동을 방해하고 조직의 강도를 증가시킨다. Collagen이외의 여러 가지 다른 세포외기질 등에 대한 연구가 있다.³⁾ Fibronectin은 당단백질(glycoprotein)으로 유착물질(adhesion molecule)으로 작용한다. 섬유아세포(fibroblast)의 유착, chemotaxis 그리고 signaling에 관여한다. Fibronectin이 증가하면 조직 결합(binding), 유착(adhesion), 강도(strength)가 증가하여 성대 진동을 방해한다. Hyaluronic acid(HA)는 성대 고유층에 전반적으로 광범위하게 존재하는 glycosaminoglycans으로 성대의 점탄성을 유지하는데 중요한 물질이다. HA는 섬유아세포에 의해 콜라겐이 생성을 억제하는 역할을 한다. HA는 조직 손상 후 2~4일에 최고로 증가하였다가 급속히 감소한다. HA가 높게 유지되는 경우에는 반흔없이 상처가 잘 치유되어 성대 반흔의 치료나 예방에 HA의 농도가 중요하다. Decorin은 성대 고유층의 상부에 존재하는 proteoglycans으로 콜라겐의 섬유 크기와 밀도를 감소시키는 항섬유화효과(antifibrotic effect)가 있는 물질이다. Elastin은 성대 고유층의 중간에 존재하는데, 점막 파동의 유연성에 관여한다.^{1,2)}

손상 후 여러 가지 세포외기질 즉, collagen, procollagen, HA, elastin, decorin, fibronectin, fibromodulin 등의 변화가 연구자에 따라 다소 차이가 있게 보고되고 있다.³⁾ 이러한 차이는 실험동물 종, 성대 손상의 정도와 손상 유발 방법, 그리고 세포외기질을 측정하는 방법에 차이로 인한 것으로 생각된다. 그러나 인간에서 이러한 세포외기질의 변화를 관찰하는 것이 매우 중요하고 필요하나 많은 어려움이 있다. 최근 인간의 성대 점막에 대한 세침흡인세포검사를 통해 성대 점막의 세포외기질의 변화를 관찰하고자 하는 연구가 진행되고 있다.⁴⁾

성대 반흔에 대한 기존의 치료법

성대 반흔을 치료하기 위한 기존의 방법은 음성치로나 발성치료에 의한 방법, 약물 주입, 그리고 수술 방법이 있다. 음성치료나 발성 치료에 의한 방법은 음성 장애를

유발한 성대 반흔을 직접 치료하는 것이 아니고 여러 가지 발성법을 이용하여 성대의 접촉을 좋게 하여 발성을 호전 시키는 방법이다. 약물 주입에는 steroid 주입법이 있다. Steroid 주사는 초기 상처에 주사하면 반흔을 감소시킬 수 있다는 연구는 있으나 완성된 성대 반흔에서는 효과가 미미하다.^{5,6)} 수술 방법으로 제1형 갑상성형술 과 여러 가지 물질을 이용한 성대 내 주입술이 현재 사용되고 있다. 성대 내 주입술에 사용되는 물질로는 환자의 근막, 지방, 콜라겐 등의 자가 물질과 HA, calcium hydroxyapatite gel, 소의 콜라겐 등의 비자가 물질 등이 사용되고 있다. 그러나 제1형 갑상성형술이나 성대 내 주입술의 치료 성적은 아직 만족스럽지 못하고 있다. 그리고 성대 반흔 조직을 제거한 후 흉터 없이 상처가 치유되는 방법이 일부 소개가 되어 있지만 매우 심한 성대 반흔에서 적용될 수 있고, 환자의 상처 치유 능력에 따라 결과가 다를 수 있다.

지금까지 제안된 치료법은 성대 반흔의 중요한 원인인 세포외기질의 변화를 조절하기 보다는 전체적인 성대 부피를 변화시키는 치료법으로 성대 점막의 세포외기질의 변화에 대한 치료법은 아니다. 그러므로 성대 반흔의 궁극적인 치료는 성대 점막의 세포외기질에 대한 치료법으로 성대 점막의 진동을 향상시키기 위해 HA, decorin, elastin을 증가시키면서, collagen과 fibronectin을 감소시키는 방향으로 진행되어야 한다.⁷⁾

성대 조직 공학에 사용되는 세포

조직공학에서 주입한 세포는 초기 구조 형성과 기능 유지에 주요한 작용을 한다. 이론적으로 성대 고유층의 섬유아세포와 동일한 자가 세포를 성대 고유층에 이식하는 것이 좋다. Thibeault 등⁸⁾은 토끼 성대에 조직을 얻어 섬유아세포로 증식시킨 후, 손상된 성대에 식염수, 자가 섬유아세포, HA 계열의 scaffold, 자가 섬유아세포와 HA 계열의 scaffold 혼합물 등을 성대에 주입하여 2개월 후 성대를 조사하였다. 자가 섬유아세포를 주입한 군에서 성대의 점탄성이 의미 있게 식염수만 주입한 군에 비해 증가하였다. 또한 fibronectin의 발현이 증가하였다. HA 계열의 scaffold 단독 또는 자가 섬유아세포와 HA 계열의 scaffold를 주입한 군에서는 pro-collagen, collagen, fibronectin의 발현은 증가하였지

만, 점탄성에는 의미있는 변화를 보이지 않았다. 이 연구는 자가 섬유아세포가 가장 바람직한 이식세포라는 것을 의미한다. 그러나 이러한 것은 실제 인간을 대상으로 연구하거나 임상에 도입하기에는 많은 제한이 있다. Chen 등⁹⁾은 인간의 성대 반흔 조직에서 배양한 섬유아세포에 telomerase reverse transcriptase 유전자를 변형하여 계속적으로 증식할 수 있는 세포주를 만들었다. 이러한 세포주는 줄기세포의 특징을 가지고 있는 것으로 보고하고 있다.¹⁰⁾

성대고유층에서 유래한 섬유아세포가 성대재생에 유리할 것으로 생각되지만, 현실적인 적용에는 많은 어려움이 있다. 그래서 다른 섬유아세포의 원천으로 개의 구강내 점막에서 유래한 자가 섬유아세포를 개의 성대에 주입하여 조직학적 그리고 기능적으로 호전되는 것을 보고하고 있다.¹¹⁾ 또한 다른 연구에서 피부의 섬유아세포를 성대에 주입한 연구가 있다.¹²⁾ 피부의 섬유아세포는 태생적으로 성대의 섬유아세포에 비해 HA 생성능력이 떨어진다. 그래서 피부의 섬유아세포를 주입한 경우 토끼에서 조직학적 호전을 보이지 않았다.

골수 유래한 중간엽 줄기세포(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC)를 이용한 손상된 성대의 재생에 대한 연구 Kanemaru 등¹³⁾이 처음 보고하였다. BMSC를 주입한 성대에 손상을 가하면 BMSC를 주입하지 않은 성대에 비해 성대 위축 감소, 육아종 형성 감소, 성대 섬유화 감소 등을 보고하였다. 또한 주입한 BMSC가 손상 후 2개월에도 성대에 존재하는 것을 증명하였으며, 성대 근육에 세포핵이 매우 진하게 염색되는 BMSC로 부터 유래된 것으로 추측되는 미분화된 세포가 관찰되는 것을 보고하였다.

골수에서 중간엽 줄기세포를 획득하기 위해서는 전신 마취 또는 국소 마취가 필요하고, 시술이 고통스럽다. 또한 골수에서 획득한 세포는 주로 조혈모세포가 많은 부분을 차지하고, 중간엽 줄기세포는 일부이기 때문에 중간엽 줄기세포를 배양하여야 하는 문제점이 있다.¹⁴⁾ BMSC를 대체하기 위한 여러 가지 중간엽 줄기세포 원천에 대해 연구가 많이 진행되고 있고, BMSC을 대신 하기 위해 가장 많이 연구되는 것이 지방유래 중간엽 줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSC)이다. Lee 등¹⁵⁾은 AMSC을 주입한 성대에

손상을 주면, AMSC을 주입하지 않은 성대에 비해 AMSC을 주입한 성대는 2개월에는 육아종 발생 감소와 성대 위축 감소가 관찰되고, 6개월에는 성대 반흔 발생이 적고 성대 위축 발생이 감소하는 것을 보고하였다. 또한 주입한 AMSC는 2개월에는 관찰되었지만 6개월 후에는 관찰되지 않았다고 보고하였다. Lee 등¹⁵⁾의 연구는 중간엽 줄기세포가 성대 재생에 도움을 줄 수 있다는 Kanemaru 등¹³⁾의 결과와 일치하였다. 또한 AMSC가 성대 반흔의 예방에도 적용될 수 있다는 결과를 보였다.

Hertegård 등¹⁶⁾은 토끼의 성대 손상을 주어 반흔을 만든 1개월 후에 인간 골수유래 중간엽 줄기세포(human BMSC, hBMSC)을 주입하였다. 줄기세포 주입 후 4주에도 hBMSC는 토끼의 성대에서 생존하는 것이 관찰되었고, 제 1형 콜라겐이 BMSC을 주입한 성대에서 감소하였다. 그러나 hBMSC 중 극소수인 0.18%에서만 토끼 성대에 생착(engraftment) 하였으나, 성대의 점탄성이 호전되었다. 중간엽 줄기세포에 비해 더 다양한 조직으로 분화할 수 있는 인간배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESC)를 손상된 토끼의 성대에 주입했을 때 hESC 중 약 5.1%가 생착하여 hBMSC에 비해 높은 생착율을 보였고, 줄기세포를 주입한 성대의 반흔이 감소하는 것을 보고하였다.¹⁷⁾ 그러나 hESC를 주입한 성대에서 토끼 연골과 섞여있는 사람의 연골 조직이 모든 예에서 발견되었고, 사람의 유전자를 가진 근육, 표피, 또는 분비선이 발견되었다.¹⁷⁾ Svensson 등¹⁸⁾은 토끼 성대에 상처를 내어 만든 성대 반흔에 hBMSC를 반흔 조직에 주입 후 3개월의 결과를 보고하였다. 줄기세포를 주입한 성대는 성대 점성과 탄성이 증가하여 정상과 비슷하다는 것을 보고하였고, 또한 제 1형 collagen과 성대고유층의 두께가 대조구에 비해 감소하는 것을 보고하였다. 주입한 줄기세포는 주입 후 3개월에는 관찰되지 않아 Lee 등¹⁵⁾의 결과와 비슷한 결과를 보고하였다. Johnson 등¹⁹⁾은 쥐의 성대 반흔에 HA의 변형시킨 Carbylan-SX(상품명: Extracel)와 mouse에서 위대한 BMSC을 같이 주사하였을 때 procollagen, fibronectin, TGF-1 beta, hyaluronidase의 발현이 증가하는 것을 보고하면서, 이러한 결과는 BMSC 단독 주입 보다 좋은 결과라고 보고하였다. AMSC

와 섬유아세포를 동시에 배양을 하면 Hepatocyte growth factor(HGF)의 분비와 HA 합성이 증가하고, collagen 합성, 세포 증식, alpha-SMA 발현이 감소하는 것을 Kumai 등²⁰⁾이 보고하였다. 성대 재생이나 성대 반흔에 줄기세포로 이용한 많은 연구가 진행되고 있으나 주입한 줄기세포가 어떠한 기전으로 손상된 성대의 재생 및 치유하고 성대 반흔을 감소시키는지에 정확한 기전에 대한 연구는 아직 없다. 이에 대한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

성대 조직 공학에 사용되는 Scaffold

구조와 기능의 관계는 조직 공학에서 주요한 부분이다. 성대와 비슷한 구조물로 성대를 대체하고자 하지만 collagen, HA, elastin, 그 외의 여러 가지 물질로 이루어진 세포외기질을 정확하게 만든다는 것은 불가능한 일이다. 성대의 조직 공학에 주로 사용되는 scaffold는 탈세포화 조직 주형(decellularized organ matrix), 생물학적 중합체(biologic polymers), 합성 생체유사 하드로겔(synthetic biomimetic hydrogels), 합성 중합체(synthetic polymer) 등으로 구분할 수 있다.²¹⁾

인간이나 동물의 비세포화시킨 조직은 쉽고, 원래의 구조를 잘 대체할 수 있기 때문에 기관이나 폐 연구 분야에서 많이 연구되고 있다. 화학적 방법이나 방사선 조사 등으로 생존하는 모든 세포와 물질을 제거하고 collagenous scaffold를 남기면 이론적으로 항체형성이 되지 않기 때문에 다른 개체나 타종으로도 이식이 가능하다. Gilbert 등²²⁾은 태생적으로 HGF를 많이 포함하고 있는 간 조직을 이용하여 성대 재생을 위한 탈세포화 scaffold(decellular liver ECM)을 개의 성대에 이식하여 조직소견 상 호전되는 것을 발표하였다. Triton X-100을 이용하여 탈세포화 간 세포외기질을 이식한 경우 collagen III/I 비율이 증가하여 치료하지 않은 것보다 유연한 간질조직을 형성하는 것을 알 수 있었다. Xu 등²³⁾은 쥐 성대에 탈세포화 소의 성대고유층 scaffold(acellular bovine lamina propria ECM)을 이식하면 성대 섬유아세포와 유착이 좋아 scaffolds 내로 섬유아세포가 침윤하는 것이 관찰하였다. 또한 이러한 scaffold를 이식한 성대의 점탄성이 정상 성대와 비슷하여 다른 종으로부터 만든 탈세포화 scaffold가 성대

재생에 유용하다고 하였다. Chan 등²⁴⁾은 탈세포화 제정 맥(decellularized umbilical vein) scaffold에 인간의 성대 섬유아세포가 침윤하면 collagen 합성이 증가하고, 성대의 점탄성이 증가하여 정상과 비슷하다고 하면서, 탈세포화 제정맥이 성대 재생을 위한 새로운 scaffold가 될 수 있다고 하였다.

성대 재생에 사용되는 생물학적 중합체의 물질로는 collagen, HA, fibrin 등이 있다. Collagen과 같은 섬유성 생물학적 중합체(fibrous biopolymers)은 많은 수분을 함유하고 불규칙적으로 배열된 섬유로 구성되어 hydrogel을 쉽게 만들 수 있다. 생체 내에 이식하면 쉽게 분해되고, 무해하다. Collagen은 매우 생체 적합한 물질이면서 생리적인 물질이기 때문에 많은 조직 공학에서 연구되고 있다. Atelocollagen은 성대에 손상을 가한 후 BMSC 또는 AMSC를 주사하여 성대 반흔을 예방하는 연구에서 사용되었다.^{13,15)} 3차원의 성대 재건을 위해 collagen hydrogel을 이용한 연구가 있지만, collagen이 매우 빠르게 섬유아세포에 의해 분해되고 fibrin 같은 세포외기질을 생성한다.²⁵⁾ 그러나 collagen의 딱딱한 기계적인 특성이 성대의 부드러운 특성과 적합하지 않다.²⁶⁾

HA는 면역학적으로 안전하고, 독성과 염증 작용이 없고, 쉽게 주입가능하기 때문에 성대 반흔을 예방하고 성대 고유층의 보강하기 위해 최상의 물질과 관심을 받고 있다.²⁷⁾ HA는 태아의 반흔없는 상처 치유에 중요하다. 일반적인 상처치유에서 HA는 초기에 증가하다가 즉시 감소하나, 태아의 반흔없는 상처 치유에서는 상처가 치유가 끝날 때까지 높게 유지된다. HA는 세포외기질을 유지 및 성장시키고, 성대의 점탄성에 중요하다. 그러나 순수한 HA는 인체에 주입하면 효소와 유리기(free radical)에 의해 성대 내에서 1주일 이내에 흡수된다.²⁸⁾

HA는 성대의 연구하는 연구자의 측면에서 2가지 면이 있다. 하나는 HA가 반흔 없는 상처 치유와 세포외기질의 유지 및 성장에 중요한 역할을 하기 때문에 초기 상처에 HA를 주입하여 반흔없는 상처 치유를 유도하여 성대 반흔을 예방하고자 하는 것이다. 다른 접근법은 HA가 성대의 세포외기질을 구성하고 유지하는 역할과 점탄성에 중요한 역할을 하기 때문에 오래된 성대 반흔에 주입하여 성대고유층을 새롭게 재생하는 것이다.

토끼 성대에 상처를 만든 후 Hansen 등²⁹⁾은 HA의 변형시킨 Carbylan-SX을 주사하여 3주 후에 성대의 섬유화가 대조군에 비해 경미한 것을 발표하였다. 또한 6개월에는 fibronectin, fibromodulin, procollagen이 대조군에 비해 감소하고 성대 조직의 경직성이 감소하였다.³⁰⁾ 이러한 소견은 HA의 변형된 Carbylan-SX를 성대 손상 상처에 주입하면 성대 반흔을 줄일 수 있다는 연구이다. Finck 등³¹⁾은 HA를 에스테르화하여 변형시킨(상품명: MeroGel) 후 성대 양성 질환 환자를 수술한 후 성대에 주입하였다. 초기에는 HA를 주입하지 않은 군과 차이가 없었으나, 장기간 관찰한 소견 상 HA를 주입한 군에서 성대폐쇄와 음성이 좋아지는 것을 보고하였다.³²⁾

토끼의 성대에 손상을 준 8주 후에 완전한 성대 반흔을 만든 후, 순수한 cross-linked HA인 Hylan B gel(상품명: Hylaform) 또는 Restylane을 성대 반흔에 주입하였다. Hylan B gel을 주입한 군과 주입하지 않은 군 사이에 성대고유층이나 점탄성에 차이는 없었다.³³⁾ 그러나 Jahan-Parwar 등³⁴⁾은 개에서 한쪽 성대에 반흔을 만든 후 1달 이후에 Hylan B gel을 점막하에 주입하였다. 주입 3개월 후에 Hylan B를 주입한 개는 성대의 점막 파동이 회복되었고, 경도의 만성 염증이 관찰되었다. Saline을 주입한 대조군에 비해 호전되었다. 3개월 이후에서도 일부에서 주입한 HA가 관찰되었다. 이러한 결과는 주입한 HA가 손상 후 성대 고유층의 재건에 도움을 준다는 것이다.

Fibrin은 혈중에 있는 fibronogen의 중합체로 지혈의 초기단계에서 섬유성 hydrogel로서 존재한다. 장점은 thrombin을 처리하여 자가 동결침전물(autologous precipitate)에서 추출할 수 있다는 장점이 있다. AMSC와 포함된 fibrin은 성대의 유사한 배양 조건에서 진동하고 적절한 탄성을 보였다.³⁵⁾

합성 생체유사 하드로겔로 poly-(ethylene glycol)-diacrylate hydrogel 등을 이용하려는 연구가 있다.³⁶⁾ 이러한 scaffold는 세포 침윤을 위해 부가적인 물질이 필요하다. 합성 scaffold로 합성 탄성계(elastomeric) 중합체가 성대의 탄성기능을 대체하기 위해 연구가 있으나 아직 만족스러운 결과는 없다.^{21,37)}

성대 조직 공학에 사용되는 물리적 자극과 화학적 성장 인자

세포가 포함된 scaffold는 여러 가지 화학적 그리고 물리적 영향에 의해 배양되는 동안 또는 이식후 계속 성숙하는 새로운 조직이다. 정상적인 성대의 점막은 세포와 세포의 기질에 영향을 미치는 고주파수의 진동이 있다. Titze 등³⁸⁾은 성대 섬유아세포를 이식하지 않은 중합체 위에 유지시킨 후 6시간 동안 배양하면서 성대와 유사한 진동을 시키면 elastin, procollagen, fibronectin의 유전자발현이 증가하는 것을 보고하였다. Cross-linked HA hydrogel에 피부의 섬유아세포를 진동기 위에서 배양하면 일시적으로 세포외기질의 변화가 발생하여 점도가 감소하는 효과를 보고하였다.³⁹⁾ 비슷한 진동기를 이용한 Wolchok 등⁴⁰⁾의 실험에서는 반대의 소견을 보고하였는데, 진동기 위해서 후두 섬유아세포와 HA hydrogel과 같이 배양했을 때 TGF beta 1이 증가하고, 세포외기질 단백질, fibronectin, collagen의 축적이 증가하고 경직성이 증가한다고 하였다. 이러한 연구의 결과는 성대의 물리적인 특징이 주입한 세포의 변화를 초래하지만 아직 어떠한 결론을 내리기는 힘든 것 같다.

정상적인 성대는 공기와 접하는 표피층이 있다. 표피층은 표피층 이하의 성대 고유층이 유지되고 분화되는데 공기와 접촉을 막는 중요한 기능을 한다. Long 등⁴¹⁾은 AMSC를 fibrin hydrogen에 혼합하여 3차원적으로 배

양하여 중배엽계통의 세포 분화와 표피세포 분화가 각각 유도하였다. 이러한 조직공학기법은 성대와 같이 두 개의 층으로 구분된 구조를 재건하는데 유용하다고 하였다.

HGF나 상피세포성장인자 등의 성장 인자가 성대 조직 공학에서 적용될 수 있다.^{41,42)} HGF는 성대의 섬유아세포의 증식을 억제하고 HA의 생성을 증가시킨다. Kwon 등⁴²⁾은 자가 AMSC와 HGF를 같이 손상된 성대에 주입하고, 대조군으로 HA를 주입하였다. 줄기세포를 주입 후 8주 후에 성대의 위축이 대조군에서 관찰되었으나, AMSC를 주입한 성대에서는 성대 위축이 관찰되지 않았다. 그리고 HGF와 AMSC를 같이 주입한 성대와 AMSC만을 주입한 성대 사이에는 섬유화의 정도가 차이가 없어 줄기세포와 같이 주입한 HGF의 효과는 미미한 것으로 보고하였다. HGF를 이용하여 성대반흔을 예방하거나 치료하고자하는 연구는 Hirano 등⁴³⁾에 동물실험이 많이 이루어졌으나 조직공학기법과 HGF를 이용한 연구는 아직 미미하다(Table 1).

결론

성대반흔을 치료하기 위해 여러 연구 기관에서 조직공학기법을 이용하여 연구하고 있고, 이것을 요약하면 표 1과 같다. 세포에서 특히 줄기세포가 많은 관심을 받고 있지만 줄기세포의 안전성에 대한 연구는 아직 미미하

Table 1. Summary of tissue engineering for vocal fold scar

Cells types	Scaffolds	Maturation
Fibroblast	Decellularized matrix	Physical factors
Autologous vocal fold ⁸⁾	Liver ECM ²²⁾	Vibration ³⁸⁻⁴⁰⁾
Autologous bucal mucosa ¹¹⁾	Bovine lamina propria ECM ²³⁾	Air interface ⁴¹⁾
Dermal ¹²⁾	Umbilical vein ²⁴⁾	
Mesenchymal stem cells	Biologic polymer	Chemical factors
Bone marrow	Collagen-based	HGF ⁴²⁾
Autologous, dog ¹³⁾	Atelocollagen ^{13,15)}	EGF ⁴¹⁾
Xerogenic, human ^{14,18)}	Hyaluronic acid-based	
mouse ¹⁹⁾	Extracel ^{19,29,30)}	
Adipose, dog ¹⁵⁾	MeroGel ^{31,32)}	
rabbit ⁴²⁾	Pure cross-linked HA ^{33,34)}	
	Fibrin ^{35,41)}	
Embryonic stem cells	Synthetic biomimetic hydrogel ³⁶⁾	
Xerogenic, human ¹⁷⁾	Synthetic polymer (?)	

다. 또한 실제 적용시 보관과 이동에 대한 문제가 있을 수 있다. Scaffold를 성대 구조와 비슷한 3차원적 구조물로 어떻게 구성할 것인가? 세포의 주입 방법에 대해서도 아직 많은 연구가 필요하다. 성대의 물리적 특징과 성장인자를 이용한 세포 분화와 조직 공학에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 성대 반흔 · 조직 공학 · 섬유아세포 · 중간엽 줄기세포 · 히알루론산.

REFERENCES

- 1) Branski RC, Verdolini K, Sandulache V, Rosen CA, Hebda PA. *Vocal fold wound healing: a review for clinicians. J Voice* 2006;20(3):432-42.
- 2) Allen J. *Cause of vocal fold scar. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Sep 22. [Epub ahead of print]*
- 3) Hansen JK, Thibeault SL. *Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring. J Voice* 2006;20(1):110-20.
- 4) Cobell W, Duflo SM, Magruffov A, Thibeault SL. *Fine needle aspiration of the vocal fold lamina propria in an animal model. Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(10):764-8.
- 5) Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PH. *Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. Ann Otol Rhinol Laryngol* 2010;119(2):133-9.
- 6) Mortensen M. *Laryngeal steroid injection for vocal fold scar. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2010 Nov 1. [Epub ahead of print]
- 7) Hirano S. *Current treatment of vocal fold scarring. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(3):143-7.
- 8) Thibeault SL, Klemuk SA, Smith ME, Leugers C, Prestwich G. *In vivo comparison of biomimetic approaches for tissue regeneration of the scarred vocal fold. Tissue Eng Part A* 2009;15(7):1481-7.
- 9) Chen X, Thibeault SL. *Novel isolation and biochemical characterization of immortalized fibroblasts for tissue engineering vocal fold lamina propria. Tissue Eng Part C* 2009;15(2):201-12.
- 10) Hanson SE, Kim J, Johnson BH, Bradley B, Breunig MJ, Hematti P, et al. *Characterization of mesenchymal stem cells from human vocal fold fibroblasts. Laryngoscope* 2010;120(3):546-51.
- 11) Chhetri DK, Head C, Revazova E, Hart S, Bhuta S, Berke GS. *Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131(6):864-70.
- 12) Krishna P, Rosen CA, Branski RC, Wells A, Hebda PA. *Primed fibroblasts and exogenous decorin: Potential treatments for subacute vocal fold scar. Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135(6):937-45.
- 13) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, et al. *Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112(11):915-20.
- 14) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
- 15) Lee BJ, Wang SG, Lee JC, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ, et al. *The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. Cells Tissues Organs* 2006;184(3-4):198-204.
- 16) Hertegård S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FH, Vidovska D, et al. *Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. Laryngoscope* 2006;116(7):1248-54.
- 17) Cedervall J, Ahrlund-Richter L, Svensson B, Forsgren K, Maurer FH, Vidovska D, et al. *Injection of embryonic stem cells into scarred rabbit vocal folds enhances healing and improves viscoelasticity: short-term results. Laryngoscope* 2007;117(11):2075-81.
- 18) Svensson B, Nagubothu RS, Cedervall J, Le Blanc K, Ahrlund-Richter L, Tolf A, et al. *Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of scarred vocal folds: analysis using a xenograft model. Laryngoscope* 2010;120(7):1370-5.
- 19) Johnson BQ, Fox R, Chen X, Thibeault S. *Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats. Laryngoscope* 2010;120(3):537-45.
- 20) Kumai Y, Kobler JB, Park H, Lopez-Guerra G, Karajanagi S, Herrera VL, et al. *Crosstalk between adipose-derived stem/stromal cells and vocal fold fibroblasts in vitro. Laryngoscope* 2009;119(4):799-805.
- 21) Long JL. *Tissue engineering for treatment of vocal fold scar. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2010 Sep 14. [Epub ahead of print]
- 22) Gilbert TW, Agrawal V, Gilbert MR, Povirk KM, Badylak SF, Rosen CA. *Liver-derived extracellular matrix as a biologic scaffold for acute vocal fold repair in a canine model. Laryngoscope* 2009;119(9):1856-63.
- 23) Xu CC, Chan RW, Tirunagari N. *A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. Tissue Eng* 2007;13(3):551-66.
- 24) Chan RW, Rodriguez ML, McFetridge PS. *The human umbilical vein with Wharton's jelly as an allogeneic, acellular construct for vocal fold restoration. Tissue Eng Part A* 2009;15(11):3537-46.
- 25) Park H, Karajanagi S, Wolak K, Aanestad J, Daheron L, Kobler JB, et al. *Three-dimensional hydrogel model using adipose-derived stem cells for vocal fold augmentation. Tissue Eng Part A* 2010;16(2):535-43.
- 26) Kimura M, Mau T, Chan RW. *Viscoelastic properties of phonosurgical biomaterials at phonatory frequencies. Laryngoscope* 2010;120(4):764-8.
- 27) Chhetri DK, Mendelsohn AH. *Hyaluronic acid for the treatment of vocal fold scars. Curr Opin Otolaryngol Head*

- Neck Surg 2010 Sep 20. [Epub ahead of print]*
- 28) Hallén L, Dahlqvist A, Laurent C. *Dextranomers in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. Laryngoscope 1998;108(3):393-7.*
 - 29) Hansen JK, Thibeault SL, Walsh JF, Shu XZ, Prestwich GD. *In vivo engineering of the vocal fold extracellular matrix with injectable hyaluronic acid hydrogels: early effects on tissue repair and biomechanics in a rabbit model. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005;114(9):662-70.*
 - 30) Thibeault SL, Klemuk SA, Chen X, Quinchia Johnson BH. *In Vivo Engineering of the Vocal Fold ECM With Injectable HA Hydrogels-Late Effects on Tissue Repair and Biomechanics in a Rabbit Model. J Voice 2010 Apr 22. [Epub ahead of print]*
 - 31) Finck C, Lefebvre P. *Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected Reinke's space after vocal fold microsurgery: first clinical experiences. Laryngoscope. 2005; 115(10):1841-7.*
 - 32) Finck CL, Harmegnies B, Remacle A, Lefebvre P. *Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected Reinke's space after vocal fold microsurgery: short- and long-term results. J Voice 2010;24(5):626-35.*
 - 33) Hertegård S, Dahlqvist A, Goodyer E. *Viscoelastic measurements after vocal fold scarring in rabbits--short-term results after hyaluronan injection. Acta Otolaryngol 2006; 126(7):758-63.*
 - 34) Jahan-Parwar B, Chhetri DK, Ye M, Hart S, Berke GS. *Hylan B gel restores structure and function to laser-ablated canine vocal folds. Ann Otol Rhinol Laryngol 2008; 117(9):703-7.*
 - 35) Long JL, Neubauer J, Zhang Z, Zuk P, Berke GS, Chhetri DK. *Functional testing of a tissue-engineered vocal fold cover replacement. Otolaryngol Head Neck Surg 2010; 142(3):438-40.*
 - 36) Liao H, Munoz-Pinto D, Qu X, Hou Y, Grunlan MA, Hahn MS. *Influence of hydrogel mechanical properties and mesh size on vocal fold fibroblast extracellular matrix production and phenotype. Acta Biomater 2008;4(5):1161-71.*
 - 37) Guelcher SA. *Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev 2008;14(1):3-17.*
 - 38) Titze IR, Hitchcock RW, Broadhead K, Webb K, Li W, Gray SD, et al. *Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses. J Biomech 2004 ;37(10):1521-9.*
 - 39) Kutty JK, Webb K. *Vibration stimulates vocal mucosa-like matrix expression by hydrogel-encapsulated fibroblasts. J Tissue Eng Regen Med 2010;4(1):62-72.*
 - 40) Wolchok JC, Brokopp C, Underwood CJ, Tresco PA. *The effect of bioreactor induced vibrational stimulation on extracellular matrix production from human derived fibroblasts. Biomaterials 2009;30(3):327-35.*
 - 41) Long JL, Zuk P, Berke GS, Chhetri DK. *Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering. Laryngoscope 2010;120(1):125-31.*
 - 42) Kwon SK, Lee BJ. *The combined effect of autologous mesenchymal stem cells and hepatocyte growth factors on vocal fold regeneration and fibrosis in vocal fold wound. Tissue Eng Regen Med 2008;5:735-42.*
 - 43) Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, Montequin DW, et al. *Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol 2004;113(10):777-85.*