

지방줄기세포에서 분화된 지방세포 주입에 의한 연부조직증대술: 예비연구

한승규 · 김현석 · 임형우 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Several suspension biomaterials are available for soft tissue augmentation. Although these gel type implants have been shown to be relatively safe and convenient, their varying degrees of resorption require repeated percutaneous injections. Previous *in vivo* and *in vitro* studies have shown that the injection of cultured human adipocytes can produce a sufficient volume effect with extended *in vivo* stability. This pilot study was undertaken to evaluate the clinical efficacy of this method. Between November 2007 and January 2008, 5 patients were treated with implants of autologous differentiated adipocytes for wrinkle correction and forehead augmentation. The contour changes of the treatment sites were investigated in accordance with the passage of time, as was the occurrence of complications. The degree of patient satisfaction was also evaluated. The injected bioimplants remained in situ. Two weeks after injection, they began to show evidence of a soft tissue augmentation effect. All patients were satisfied with the overall results of this method, and no complications occurred during the follow-up period. The results obtained indicate that differentiated human adipocytes may be successfully injected as living grafts for long-term implants, and that this method is a well tolerated, effective way of performing soft tissue augmentation.

Key Words: Adipocyte, Skin aging, Soft tissue augmentation

A Pilot Clinical Study on the Use of Differentiated Adipocyte Injection for Soft Tissue Augmentation

Seung-Kyu Han, M.D.,
Hyon Surk Kim, M.D.,
Hyung Woo Lim, M.D.,
Woo Kyung Kim, M.D.,

Department of Plastic Surgery Korea
University College of Medicine, Seoul, Korea

Address Correspondence: Seung-Kyu Han,
Department of Plastic Surgery, Korea
University Guro Hospital, 97 Guro-dong,
Guro-gu, Seoul 152-703, Korea.
Tel: 02) 2626-3333 / Fax: 02) 868-6698 /
E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 연구에서 사용한 배양된 지방세포(Adipocell)는 ㈜안트로젠에서 지원하였음.

I. 서 론

최근 다양한 피하조직삽입물질이 안면부 주름이나 연부조직결손을 교정하기 위해 상업적 목적으로 개발되었다. 그 종류도 다양하여 현재까지 콜라겐이나 히알루론산 제품 등 전세계적으로 약 100여종에 이르는 다양한 치료제가 개발되어 이용되고 있다. 이 방법은 비교적 안전하고 주입이 편리하나 다양한 체내흡수 정도로 인하여 반복주입을 필요로 한다는 큰 단점이 있다.¹⁻⁴

이런 단점을 극복하기 위하여 배양된 자가지방세포를 주입하는 방법이 개발되어 아디포셀(Adipocell)이라는 이름으로 제품화되었는데, 그 동안 동물실험을 비롯한 여러 연구와 함몰반흔 교정을 위한 임상시험을 통

하여 그 효과와 안정성이 입증되어⁵⁻⁷ 최근 대한민국 식약청이 이 방법의 사용을 최종 승인함으로써 향후 우리나라에서 분화된 자가지방세포의 주입을 통한 연부조직증대 시술이 보편화될 것으로 기대된다.

아디포셀은 분화된 미성숙 지방세포를 세포현탁액(culture media)과 혼합한 형태로, 미성숙 지방세포의 크기는 직경이 20 - 50 μm 인데 체내 이식 후 숙주 주변 조직에 정착하고 성숙하여 직경이 100 μm 이상으로 증가함으로써 이식 후 점차 그 부피효과를 나타내게 되는 것이다.^{5,8,9} 미성숙 지방세포는 동물이식 실험결과나 3차원 배양 결과 완전히 성숙하여 자연적으로 형성된 지방세포와 동일한 조직형태가 되는 데 약 1개월 정도 걸린다고 알려져 있으며, 창상, 여드름, 수술 등으로 인한 함몰반흔

의 임상시험에서도 1개월 정도의 세포성숙기간을 통해 체내에 완전히 정착하여 교정효과를 나타냄을 확인한 바 있다.^{7,8}

본 연구는 함몰반흔의 교정에 있어 만족할만한 결과를 보였던 분화된 미성숙 자가지방세포의 주입이 반흔이 아닌 주름 등 피부 및 연부조직보충이 필요한 환자에 있어서도 효과를 얻을 수 있는지를 알아보고자 계획되었으며, 이번 연구는 예비연구로서 세포주입 후 6주까지의 결과를 발표하고자 한다. 기존의 치료제인 필러나 자가지방이식술 등의 경우 이식 후 흡수율이 증가되므로 6주라는 기간은 주입물의 효과를 검증하기는 불가능한 기간이나, 갓 분화된 어린 지방세포를 주사하는 경우는 치료부위의 부피유지가 기존의 제품들과는 확연히 다른 양상을 나타낸다. 즉, 주입 후 세포가 성숙될 때까지는(앞에도 언급했듯이 약 1개월) 시간이 지날수록 교정효과가 증가하는 현상을 보이게 되므로 6주라는 기간은 비록 이 치료법의 최종결론을 내릴 수는 없으나, 이식된 지방세포가 정착하여 교정효과를 나타낼 수 있는지를 확인하는 데는 적당한 기간이라 판단된다.

II. 재료 및 방법

가. 자가지방세포의 분리 및 배양

사전에 동의서를 받은 후 환자의 복부로부터 지방흡입을 통하여 피하지방조직을 채취하였다. 채취된 지방조직은 (주)안트로젠으로 이송되어 배양된 미성숙 자가지방세포 주사제인 아디포셀이 제조되었다. 제조방법을 간단히 기술하면 다음과 같다.

오염된 혈액을 제거하기 위해서 채취한 조직은 Kreb's ringers buffer(KRB; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)로 최소 3번 세척하였다. 지방흡입된 조직검체는 37℃에서 80분 동안 1%의 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)과 0.025% collagenase(Type I)(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)가 포함된 1% KRB에 간헐적으로 진동시키면서 침침(precipitate)시켰다. 부유하는 지방세포는 300 × g로 원심분리하여 기질-혈관 분획(stromal-vascular fraction)으로부터 분리하였다. 기질-혈관 분획은 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 DMEM-Ham's F-12 medium(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 24시간에서 72시간까지 배양하였다.

배양 후, 다른 비점착성 세포를 제거하기 위해서 플라스크를 phosphate buffered saline(PBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 세척하였다. 점착된 세포는 7일에서 11일간 증식을 유도하였으며, 이렇게 증식된 지방전구세포는 DMEM-Ham's F-12 medium에 3% FBS, biotin(33 μmol/L), pantothenate(17 μmol/L), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 인간재조합형인슐린과 indomethacin(0.2 mmol/L)이 포함된 분화배양액에서 지방세포 분화를 유도하였다. 분화된 지방전구세포는 광학현미경하에서 섬유모세포와 비슷한 형태의 세포로부터 지방공포(lipid vacuole)가 포함된 원주세포로 형태학적인 변화를 보였다. 이렇게 얻어진 지방세포는 3.8×10^7 cells/mL씩 세포현탁배지에 재부유시킨 후 바이알에 넣어 바로 병원으로 다시 이송되어 환자 치료에 사용되었는데, 처음 지방조직 채취 시부터 환자에게 시술될 상태로 제조될 때까지의 기간은 20 - 25일이었다.

나. 시술방법

바이알 내의 세포들이 3차원적으로 균일하게 혼합되도록 1 mL 주사기를 이용하여 부드럽게 섞어 준 후 25 게이지의 주사바늘 또는 blunt-end cannular로 연부조직보충이 필요한 부위의 진피층 및 진피하층에 주입하였다. 주입량은 환자에 따라 최소 4 cc(세포 1.52×10^8 개)에서 최대 10 cc(세포 3.8×10^8 개)까지 주입하였다. 주입시 세포들이 치료부위에 균등하게 이식되도록 주의하였는데 그렇더라도 주입물이 불규칙한 모양으로 이식되었을 경우는 주입직후 손가락으로 약간의 압력을 가하여 즉각적인 교정을 하였다. 피지선이 발달하고 모공이 큰 부위에는 주입을 하지 않았다.

다. 연구대상 및 판정

2007년 11월부터 2008년 1월까지 연부조직보충이 필요했던 28세에서 47세 사이의 총 5명 환자를 대상으로 하였다. 5명의 환자 중 전두부 중대를 원했던 경우가 1례, 콧망울 옆의 팔자주름과 안검주름 교정을 원했던 경우가 4례였다.

이들 5명을 대상으로 시술자 및 환자 자신이 주입물의 부피변화(치료효과와는 무관한, 주입 후 시간의 흐름에 따른 주입물의 실제 부피의 가감) 및 연부조직보충 효과(치료효과를 보기 위한 것으로서, 주관적인 함몰의 교정 여부 및 정도), 부작용여부를 주입 후 6주까지 관찰하였다. 환자의 주관적 만족도도 조사하였는데, 시술

전반에 대한 만족도를 매우 불만족 1점, 매우 만족 5점의 5단계 Visual Analogue Scale(VAS)을 이용하여 평가하였다.

III. 결 과

시술 직후 주입 부위가 경증도 발적을 보였으나 1-2일 후에는 완전히 정상 피부색으로 회복하였다. 기존의 지방이식술에서 빈번하게 발생하는 심각한 멍, 부종 등이 발생되지 않으므로 이식 후 곧바로 일상생활이 가능하였다.

5명의 환자 모두에서 시술 직후와 비교해 볼 때 3-5일까지는 조직의 부종과 세포와 함께 주입된 배양액에 의해 발생했던 시술부위의 과도한 부피증가가 감소하였다. 이 후 큰 부피의 변화가 없다가 주입 후 약 2주 후부터는 점차 주입부가 올라오면서 교정효과를 나타내기 시작하였다. 교정효과의 변화는 환자에 따라 차이를 보였는데, 환자의 주관적 결과를 보면 시술 첫 2주에서 3주까지 부피가 증가하다가 3주 후부터 부피가 큰 변화 없이 6주까지 유지되었다고 느낀 환자가 2명, 2주 후부터 4주까지는 부피가 오히려 증가하다가 그 후는 부피의 변화를 느끼지 못했다는 환자가 3명이었다. 그러나 5명 모두 시술 전에 비해 본 연구의 최종관찰시기인 6주까지 연부조직의 보충이 확실히 이루어졌다고 평가하

였다.

관찰기간 동안 감염, 거부반응, 육아종 형성이나 켈로이드 형성 등의 부작용은 전혀 관찰되지 않았으며, 1명의 환자에 있어서 시술 1주일 후부터 안검 외측부에 약간의 불균등한 피부상태를 보였으나 시술자나 환자 모두 교정을 요할 정도라고는 판단하지 않아 경과관찰 중이다.

5명 환자의 만족도에 대한 Visual Analogue Score는 5점 2명, 4점 2명, 3점 1명으로 이 방법에 대해 상당히 만족하였는데 3점으로 평가한 환자는 교정효과가 기대보다 조금 낮다는 것이 아쉽다는 평가였다. 그러나 5명 환자 모두 본 시술법이 전혀 수술 받은 흔적없이 아주 자연스런 모양을 나타내는 것에 대해 만족해하였다 (Fig. 1, 2).

IV. 고 찰

1899년 고환절제술 환자에게 파라핀을 이용한 음낭 확대술을 시행한 것을 시초로 주사용 삽입물의 사용이 시작되었으며,¹⁰ 이 후 여러 가지 삽입물의 발달과 사용이 이루어져 왔다.

이상적인 삽입물질은 자가조직이거나 인체적합성이 뛰어나 염증반응 등의 부작용을 일으키지 않아야 하고, 주사로 쉽게 주입하는 등 시술이 간단하며, 수술로 인한 새로운 흉터가 생기지 않아야 하고, 자연스러운 피부상



Fig. 1. A 46-year-old woman was treated with cultured adipocyte injection for nasolabial fold correction. (Left) Preoperative view. (Center) Six days after treatment. (Right) Six weeks after treatment.



Fig. 2. A 26-year-old woman was treated with cultured adipocyte injection into the forehead for correction of depressed contour. (Aboves) Preoperative view. (Meddles) Six days after treatment. (Belows) Six weeks after treatment.

태를 유지한 채 무한하고 지속적인 결과를 얻을 수 있어야 한다. 분자생물학과 조직공학기술의 비약적인 발전으로 많은 새로운 물질들이 등장하였으나 대부분은 기존의 물질들보다 더 나은 결과를 보이리라는 기대를 충족시키지 못하였다. 이상적인 주입물에 가깝도록 해마다 많은 종류들이 등장해 각 물질들마다 고유한 장단점을 가지고 있으나, 쉽게 흡수되어 장기간 관찰시 불만족스러운 결과를 보이는 점은 모든 주입물들의 공통적인 단점으로 지적되고 있다.

현재 연부조직 증대를 위해 사용 중인 기존 필러들은 일정기간 후에 그 용적이 감소하는 것으로 알려져 있다. 보통 이식 직후 가장 좋은 효과를 나타내고 동시에 곧바로 흡수가 시작되어 짧게는 3-6개월 이내에 완전히 사라지므로 흡수율이 이식 직후부터 지속적으로 상승하는

추이를 보인다. 자가지방이식술의 경우도 이식 후 상당수가 재흡수된다는 점을 고려하여 150-200%의 지방으로 과다이식을 실시하지만 과다이식에 따른 심각한 부종, 멍, 이식부위의 괴사와 같은 부작용을 유발할 수 있을 뿐만 아니라 이 또한 상당수가 재흡수되어 소량만이 남는 것으로 알려져 있다.

배양된 세포주입방법은 1995년 자가섬유모세포를 주입하여 주름이나 반흔 등의 진피와 피하층의 결손을 위한 역동적 단백질 회복기법으로 사용된 이래 성형외과 의사에게 새로운 치료의 장을 열어주었다. 자가배양되어 증폭된 섬유모세포는 교정효과가 수년간 혹은 영원히 지속되는 단백질 복구기법을 마련하였으며, Boss 등¹¹⁾은 이와 소의 콜라겐의 혼합을 이용하여 그 지속력을 무한한 시한까지 연장하였다고 보고한 바 있다. 저자들

의 경우도 실제 환자들에서 배양된 자가섬유모세포를 Restylane과 혼합하여 주입함으로써 주입된 세포의 생존과 진피기질의 형성을 유도하여 Restylane만 사용 시에 얻을 수 없는 장기적 연부조직 증대 효과를 얻을 수 있음을 확인한 바 있다.^{12,13}

그러나 섬유모세포 주입방법은 우리나라에서는 아직 상품화된 것이 없어 시술자가 세포의 분리 및 배양기술이 있어야 하며 이러한 과정에 대한 식약청의 허가도 받아야 하는 번거로움이 있다. 또한 섬유모세포의 획득을 위하여 적은 양이긴 하나 피부를 채취해야 하며, 노출된 피부의 조작을 통하여 세포를 분리 배양하므로 세포배양과정 중 약 1,000개/gm에 달하는 피부의 정상적인 서식미생물에 의한 오염이 생길 확률도 높다. 반면 Adipocell은 세포배양과정에 대한 식약청의 승인을 취득함으로써 이런 세포치료 방법의 문제점을 극복하여 세포치료에 대한 특별한 지식이나 기술이 없는 의사라도 누구나 편리하게 시술할 수 있는 방법이다. 또한 피부채취 없이 지방흡입만으로 간단히 지방조직을 획득하며, 외기와 접촉이 없는 피하의 조직에서 세포를 분리 배양하므로 피부서식미생물에 의한 오염의 확률도 낮다.

본 연구를 통해 관찰된 배양된 지방세포 주입방법의 흡수율 추이를 살펴보면 동물실험시의 결과와 마찬가지로 이식 직후에는 이식 후 나타나는 부종과 이식과정에서 사용된 세포현탁액의 재흡수 등 때문에 흡수율이 증가하다가 이후 안정되는 양상을 보였다. 이는 기존의 치료제인 필러나 자가지방이식술과는 확연히 다른 현상이다.

본 지방세포주입방법의 장점으로서는 자가조직을 이용함으로써 환자에게 심리적 안정감을 주고, 시술방법이 간단하여 수술에 대한 부담감없이 외래에서 시행가능하며, 부종이 거의 없고 환자가 시술 즉시 효과를 확인할 수 있어 의사와 환자간의 의사소통에서의 오류를 최소화 할 수 있는 점 등을 들 수 있다. 그러나 세포주입 시에 주의할 점을 강조하고 싶다. 앞서도 언급했듯이 시술 초기 한명의 환자에서 관찰된 주입부위 피부의 볼록함은 세포주입시 주입물의 균등분배를 정확히 하지 않고 주입 후 손가락의 압력만으로 조정을 하였기 때문이라 생각되며, 이 후에는 주입 시 섬세하게 균등분배를 함으로서 이와 같은 현상을 방지할 수 있었다. 따라서 세포주입 시 처음부터 정확히 주입부에 균등하게 분배하여 주사하는 것이 중요하다고 판단된다.

본 연구결과 주입된 미성숙지방세포들이 주입 후 인체 내에서 생착하고 성숙하여 연부조직보충효과를 나타낼 수 있음이 확인되었다. 많은 증례수의 장기 추적관찰, 부피감소에 대한 정량적 결과의 비교, 다른 세포치료방법과의 차이점, 배양된 세포 수와 결과에 관련된 통계적 검증 등이 필요하다고 사료된다. 본 연구가 실제 환자를 대상으로 시행한 것으로 객관적 결과 분석에 제한이 있어 아쉬운 점이 있는 만큼 향후 더 객관적인 결과의 분석과 비교가 진행되기를 희망한다.

V. 결 론

연부조직보충 목적으로 주입된 분화된 미성숙 자가 지방세포들이 주입 후 인체 내에서 생착하여 성숙과정을 거쳐 연부조직보충 효과를 거둘 수 있는지를 알아보기 위해 실제 환자를 대상으로 본 예비연구를 진행한 바, 주입된 지방세포는 성공적으로 생착하고 성숙하여 부작용 없이 충분히 연부조직보충 효과를 나타낼 수 있음이 확인되었다.

REFERENCES

1. Knapp TR, Kaplan EN, Daniels JR: Injectable collagen for soft tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 60: 398, 1977
2. Ersek RA, Beisang AA 3rd: Bioplastique: a new textured copolymer microparticle promises permanence in soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 87: 693, 1991
3. Duranti F, Salti G, Bovani B, Calandra M, Rosati ML: Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol Surg* 24: 1317, 1998
4. Alster TS, West TB: Human-derived and new synthetic injectable materials for soft-tissue augmentation: current status and role in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 105: 2515, 2000
5. Cho SW, Kim I, Kim SH, Rhie JW, Choi CY, Kim BS: Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 588, 2006
6. Kim MH, Kim I, Kim SH, Jung MK, Han S, Lee JE, Nam JS, Lee SK, Bang SI: Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: a potential new source for adipose tissue regeneration. *Cytotherapy* 9: 468, 2007
7. Bang SI: *Clinical trial of autologous differentiated adipocytes*. Abstracts from the 63th Conference of the Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons. 2007, p 297
8. Glatz FR, Kalkanis J, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Mowlawi A: Volume analysis of preadipocyte injection for vocal cord medialization. *Laryngoscope* 113: 1113, 2003
9. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: Surface protein characterization of

- human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189: 54, 2001
10. Klein AW, Elson ML: The history of substances for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* 26: 1096, 2000
 11. Boss WK, Usal H, Chernoff G, Keller GS, Lask GP, Fodor PB: Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. *Clin Plast Surg* 27: 613, 2000
 12. Yoon ES, Han SK, Kim WK: Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within Restylane for soft tissue augmentation. *Ann Plast Surg* 51: 587, 2003
 13. Han SK, Shin SH, Kang HJ, Kim WK: Augmentation rhinoplasty using injectable tissue-engineered soft tissue: a pilot study. *Ann Plast Surg* 56: 251, 2006