(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0007092
(43) 공개일자 2023년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 5/073 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
C12N 5/0604 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0087902
(22) 출원일자 2021년07월05일
심사청구일자 2021년07월05일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
공일근
경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 1802호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)
시드라트타빈다
경상남도 진주시 내동면 신율길 11-1 201호
(74) 대리인
위병갑

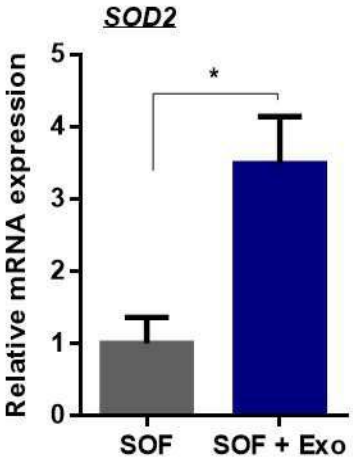
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **엑소좀을 유효성분으로 포함하는 동결수정란 보호용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 동결수정란의 동결시 발생하는 산화 및 물리적 스트레스를 완화하여 배아의 품질을 유지할 수 있는 조성물에 대해 제공하는 것이다. 본 발명의 조성물은 동결수정란 관련한 산업에 응용할 수 있으며, 그 대상은 사람, 가축 등으로 대상의 국한되지 아니한다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
C12N 5/0682 (2013.01)
C12N 2509/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106452
과제번호	2020R1A2C2006614
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	항노화 유전자치료를 통한 노령의 공란우에서 효과적인 수정란 생산체계의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	농업생명과학연구원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

엑소좀을 유효성분으로 포함하는 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 엑소좀을 1 내지 10% 첨가하는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 부화율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Cavity 팽창 속도를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 부화 속도를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 동결시 발생하는 산화 및 물리적 스트레스로부터 보호하는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TJ 복합체 보존을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 TJ 복합체 보존은 영양배엽 상피 라이닝(Lining)을 유지 및 회복하는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 이온 과잉축적을 방지하여 삼투압의 평형을 유지하는 것을 특징으로 하는, 동결수정란 보호용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동결수정란의 동결 및 해동시에 발생하는 스트레스로부터 보호하는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물에 대해 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] EVs(Extra-cellular Vesicles)는 세포가 세포 외부로 방출하는 소낭으로, 이에는 MVs(Microvesicles Vesicles), Apoptotic body, Exosomes 등을 포함한다. 과거에는 이러한 세포방출 소낭들이 세포배설의 의미에서 이해되었는데, 많은 연구들을 통해 그들의 또 다른 크기에 따라 그리고 그 역할에 따라 서로 구분할 수 있지만, 세포간 정보교환의 필수적인 이동매개라는 공통점으로 포괄적으로 이해될 수 있다. 실제로 이들 EVs는 세포로부터 유래하여 다른 세포의 대사를 자극하거나 억제하는 작용을 한다. 이와 같은 작용은 기존 세포 유래 호르몬이나 사이토카인 등이 하는 것으로 널리 알려졌는데, 엑소좀 또한 비슷한 역할자로 대두된 것이다.

[0003] EVs는 생리학적 현상, 조직 항상성, 병리학적 현상규명에 있어서 매우 중요히 다뤄질 수 있다. 기본적으로 EVs는 이들을 방출하는 모세포의 대략적인 특성과 상태를 반영하고 있지만, 모세포가 가진 모든 내용을 전달하는 것은 아니다. 이들이 모세포로부터 다른 세포에게 이동시키는 물질은 단백질(Proteins), 대사물질(Metabolite), 핵산(Nucleic acids) 등의 생체유래물질이며, 수용세포(Recipient cell)로 전해짐에 따라 세포간 신호전달 역할이 수행되는 것이다.

[0004] 엑소좀(Exosome)은 EVs의 하나로, 그 중에서도 가장 작은 20 내지 100 nm 정도의 직경을 갖는 소낭성 입자이다. 앞서 언급하였듯 엑소좀은 단백질을 포함한 생체유래물질들을 수송하는 역할을 한다.

[0005] 한편, 동결수정란은 효율의 측면에서 문제가 잔존하고 있는데, 그 이유는 수정란의 동결과 해동시에 발생하는 드립의 누출을 비롯한 스트레스로 인해 본래의 수정란에 비해 품질이 저하되는 현상 때문이다. 이에 따라 수정란의 수정율 또한 감소되는 문제가 잇따른다. 따라서, 본 발명은 상기의 문제점을 개선한 엑소좀을 유효성분으로 하는 동결수정란 보존용 조성물에 대해서 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2226182호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 동결수정란의 동결 및 해동시에 발생하는 스트레스로부터 보호하는 효과를 가진 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 동결수정란 보호용 조성물에 대해 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 엑소좀을 1 내지 10% 첨가하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 부화율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 Cavity 팽창 속도를 향상시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 부화 속도를 향상시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 동결시 발생하는 산화 및 물리적 스트레스로부터 보호하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 TJ 복합체 보존을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 TJ 복합체 보존은 영양배엽 상피 라이닝(Lining)을 유지 및 회복하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 이온 과잉축적을 방지하여 삼투압의 평형을 유지하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 동결수정란의 동결 및 해동시에 발생하는 스트레스로부터 보호 효과가 있는 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공하여 저하되는 부화율, 생존율을 개선하는데 기여하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 해동 후 BL 재팽창 및 부화율에 대해 비교한 도이다(a: BL 부화율 및 생존율, b: 24시간, 48시간에서의 BL 부화율, c: 해동 후 0, 12, 24 및 48시간 BL 현미경사진, d: 냉동 생존에서 유전자 발현).

도 2는 엑소좀 첨가군 및 미첨가군 BL의 생존율 및 Cavity 팽창율에 대해 나타낸 도이다.

도 3은 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 해동 후 산화 및 물리적 스트레스를 비교한 도이다(a, b: 산화 스트레스 관련 유전자 mRNA 발현량, c, d: 물리적 스트레스 관련 유전자 mRNA 발현량, e: TUNEL 분석 결과 사멸세포(빨간색) 및 비사멸세포(파란색), f: 셀당 BL의 수, g: BL당 TUNEL로 측정한 양성(+)세포의 평균).

도 4는 ROS 분석을 통한 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 생존율 형광사진 및 그래프를 나타낸 도이다.

도 5는 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 지질 대사 관여 유전자의 mRNA 발현량을 측정하여 나타낸 도이다(a: PPARα, b: APOA1, c: CPT1).

도 6은 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 영양배엽의 형태 유지 및 접합점의 보존에 대해 비교한 도이다(a: Blastococel 재팽창 모델, b, c: 해동 후 24시간 BL에서 재팽창 및 부화시 CDX2 발현량 이미지, d: 접합점 관련 유전자 mRNA 발현량, e: 해동 후 24시간의 BL에서 CD44 발현 SEM 사진, f: CD44 발현량 정량 그래프).

도 7은 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 해동 후 BL의 TJ 복합체 완전성과 접합점 안정성을 비교한 도이다(a: TJ 복합체 관련 인자의 mRNA 발현량. b: TJ 복합체의 BF, 4 kDa FITC-dextran 이미지, c: 측정된 Cavity의 High·Low 시그널을 형광 측적한 것을 정량화한 그래프).

도 8은 엑소좀 첨가군 및 미첨가군의 삼투압의 균형에 대해 비교한 도이다 (a: AQPs 및 Na^+/K^+ ATPase 서브 유닛 알파 1(ATP1α1)의 mRNA 발현량, b: 부화(Hatching) 동안 AQP3의 단백질 발현, c, d: 공초점(Confocal) 이미지는 표시된 배지에서 배양된 재확장된 해동 후 BLs에서 AQP3의 발현과 이를 정량화한 그래프, e, f: 동결 후 생존한 BL의 ATP1α1 측정한 면역 형광 사진과 이를 정량화한 그래프).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 동결수정란 보호용 조성물에 대해 제공하는 것이다.

[0020] 이하, 본 발명의 조성물에 대해 상세히 설명하기로 한다.

[0022] 본 발명에서 "물리적 스트레스"는 세포의 팽창과 응축에 따라 발생하는 열 충격을 비롯한 온도의 변화에서 오는 스트레스를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.

[0024] 상기 BL은 Blastocyst stage를 의미하며 이는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일예로 합성난관액(SOF) 배지에

서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 박테리오파지는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.

[0025] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 생물의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산안모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

[0027] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.

[0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0031] **<준비예 1> 체외 배아 생산**

[0032] 한국 토종 한우 젖소의 난소는 지역 도축장에서 채취하여 37.5℃에서 생리 식염수(0.9% NaCl)로 실험실로 운송되었다. 3개 이상의 콤팩트층으로 이루어진 적운 난모 세포 복합체(COCs)에 100 IU/mL의 페니실린 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 TL-HEPES 완충 배지로 흡인(Aspirate)하였다. TL-HEPES 배지에서 연속적으로 세척한 후, COCs를 세척하고 10%(v/v) 소태아혈청(FBS), 1 μg/mL Estradiol-17β, 10 μg/mL 난포 자극 호르몬(FSH), 0.6 mM 시스테인 및 0.2 mM 나트륨 피루베이트가 보충된 TCM-199에서 성숙시켰다. 24시간 동안 시험관내 성숙(IVM)시킨 후, COC는 냉·해동된(Frozen-thawed) 정액 빨대를 사용해 $1x10^6$정자/mL을 투입하여 수정되게 하였다. 체외수정은 체외수정배지(IVF, 타이로드 솔루션과 6 mg mL^{-1} BSA, 22 mg/mL 나트륨 피루베이트, 100 IU/mL 페니실린 및 0.1 mg mL^{-1}의 스트렙토마이신으로 구성)에 넣어 배양하였고 적운 세포는 반복적인 피펫팅으로 제거하였다. 제거된 추정 접합체(Presumptive zygote)를 합성난관액(SOF)배지에서 최대 8일 동안 38.5℃에서 습도가 유지되고 5%의 CO_2존재하는 조건에서 배양하였다.

[0034] **<준비예 2> 엑소좀 첨가 방법**

[0035] 체외 배양(IVC)시 44 μg/mL 피루브산 나트륨($C_3H_3NaO_3$), 14.6 μg/mL글루타민, 10 IU/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신, 3 mg/mL FBS 및 310 μg/mL 글루타티온(Glutathione)이 첨가된 합성난관액(SOF)배지는 BL단계

(Blastocyst stage)까지 사용되었다. 합성난관액(SOF)배지에 엑소좀을 보충하기 위해 100배 희석된 DPBS 용액(Dulbecco의 phosphate-buffered saline)에서 추출한 엑소좀 3%를 합성난관액(SOF) 배지에 첨가했다. 엑소좀은 체외 배양된 소의 BOECs-단층에서 분리된 것으로 이를 펠릿화하기 위해 100,000 × g에서 4℃에서 60분간 원심분리기(BECKMAN L8-M; SW41T1 rotor)를 사용하여 원심분리하였다(Sidrat et al). 원심분리하여 획득한 것을 DPBS에 현탁하고 분취하여 -20℃에 보관하였다. 이렇게 제조된 엑소좀 펠릿은 나노 추적 분석 결과 PBS에서 mL 당 3×10^{8}개이고, 사이즈는 80 내지 150 nm로 확인되었다. 합성난관액(SOF) 배지에서 보충을 위한 3% 엑소좀 농도가 선택되었으며, 이는 소 배아의 발달에 대한 이전 조사를 기반으로 1 내지 10% 범위의 모든 테스트된 엑소좀 농도 중에서 가장 우수한 배아 발달이 이루어지는 것으로 확인되었다(대한민국 특허 제10-2021-0012330호). 배아는 38.5℃에서 5% CO_2의 습도를 유지하는 조건하에 4웰 플레이트(Nunc, Roskilde, Denmark)에서 엑소좀 첨가 및 미첨가한 배지를 사용하여 BL 단계를 배양하였다. 7일째에 배양 배지에서 팽창한 이후에 냉장으로 보관하였다. 전체 배아의 발달 데이터는 기록하였고 이를 분석하였다.

[0037] **<준비예 3> 냉동 보존 및 해동절차**

[0038] 동결 보존은 금 표준 동결절차(Gold standard freezing procedure)인 에틸렌글리콜(Ethylene glycol) 기반 동결 프로토콜을 사용하였다. 7일째 팽창한 배아를 등급 1 또는 등급 2의 DPBS를 사용하여 0.5%(w/v) BSA 용액으로 5분 동안 세척했다. 그 후 삼투압 유지를 위해 1.8 M 에틸렌글리콜 동결 보호 배지(0.1 M 수크로스 및 0.5% BSA 용액이 첨가된 배지)에서 10분 동안 배양하였다. 그 다음 0.25 mL 플라스틱 빨대에 넣고, 동결제어시스템(CL-8800i : Cryo-Logic, Blackburn, Victoria, Australia)을 사용하여 배아를 천천히 동결시켰다. 동결된 배아를 -7℃에서 5분 동안 유지하고 액체 질소에 담근 면봉으로 시드(Seed)하여 배아 위 또는 아래의 동결 보호 용액에서 얼음 결정 형성을 유도하기 위해 5분 동안 기다리고, 마지막으로 -0.5℃/min에서 -35℃로 냉각하였다. 그 다음 빨대를 액체 질소에 넣었다. 냉동 보존한 배아를 액체 질소에 담근 뒤 적절하게 표지된 잔에 조심스럽게 옮겨 해동될 때까지 보관하였다. 배아를 해동하기 위해 빨대를 10초 동안 상온에 두고 37℃의 수조에 20 내지 25초 담갔다. 그 후, 팽창되거나 부화한 것을 1x PBS로 세척하고 추가 실험 분석을 위해 4% 파라포름알데히드에서 고정하거나 라이브(Live) 상태인 것을 사용했다. 유전자 발현 분석을 수행하기 위해 뉴클레아제가 없는 물로 3번 세척하고 액체 질소에서 즉시 스냅 동결하여 -80℃에서 에펜도르(Eppendorf) 튜브에 보관했다.

[0040] **<실시예 1> 생존율, 부화율 및 재팽창율 평가**

[0041] BL 재팽창은 냉동-해동된 배아가 성공적으로 이식이 되었다는 것을 의미한다. 동결-해동주기 동안 엑소좀 첨가의 효과를 측정하기 위해, 엑소좀 보충 배지의 존재 및 부재 하에 배아를 배양하고, 7일째 냉동보존을 위해 각 그룹에서 고품질 BL을 선택하고 해동 후 생존율 및 부화율을 측정하였다. 냉동 보존 배지에서 잔류물을 완전히 제거하기 위해 합성난관액(SOF) 배지에서 연속 세척한 후, 냉동 생존 배아를 엑소좀 첨가군 및 엑소좀 미첨가군 배지에서 회수했다.

[0043] 시간에 따른 엑소좀 보충시 BL의 재팽창율 및 부화율에 미치는 영향을 확인하기 위해 배양 24시간 및 48시간에 재팽창 및 부화에 대해 각각 기록하였다. 재팽창율 및 부화율을 계산하기위해 엑소좀 첨가군 및 엑소좀 미첨가군에서 생존한 BL 배아수를 카운트하였고, 이에 대해 나타낸 것이 표 1이다. 엑소좀 첨가군은 미첨가군에 비해 동결 해동 후 부화율을 크게 향상시켰다.

표 1

[0045]

군(그룹)	해동 후 BL(*n*)	총 생존율 BL(%)	부화율(%)		총 부화율 (%)
			24h	48h	
엑소좀 미첨가 SOF	101	88 (87±0.7)	27 (29.8±2.2)	29 (33.9±3.0)	56 (63.9±0.9)
엑소좀 첨가 SOF	128	114 (89.1±0.8)	75 (65.4±2.8)	22 (19.4±2.6)	97 (84.8±1.4)

[0047] 엑소좀 첨가군과 비첨가군 간에 BL 생존율을 비교했을 때, 유의한 차이가 없었다. 부화시간을 비교하여 보면, 상기 표 1에 나타난 바와 같이 엑소좀 첨가군은 대부분 해동 24시간 이내에 부화하는 것으로 나타난 반면, 엑소좀 미첨가군은 부화의 속도가 엑소좀 첨가군에 비해 느렸다(도 1a, b).

[0048] 엑소좀 첨가군에서 BL은 동결 후 해동시 빠른 회복률을 보였다. 외부 영양배엽 사이의 포배강(Blastocoel) 및 투명대(Zona pellucida) 재팽창 회복율 100%, 80%, 60%에 대한 예시와 간격을 측정한 결과를 도 1c에 나타냈다. 도 1c를 보면, 해동 후 3시간 후 재팽창 정도가 엑소좀 첨가군이 미첨가군보다 빠르게 재확장 되는 것으로 관찰되었다. 이를 표로 나타낸 것이 표 2이다. 엑소좀 첨가군이 비첨가군에 비해 80 내지 100%의 비중이 보다 높았다.

표 2

[0050]

재팽창율(%)	엑소좀 미첨가군(*n*)	엑소좀 첨가군(*n*)
60	31.8±3.6%(28)	28.0±2.4%(32)
80	15.9±1.5%(14)	20.1±1.2%(23)
100	5.6±0.9(5%)	19.2±2.2%(22)
총 재팽창된 BLs	53.4±3.4(47%)	67.5±4.2%(77)
총 생존한 BLs 수(*n*)	88	114

[0052] 도 1c를 보면, 해동 후 6, 12, 24 및 48시간에 기록된 이미지를 나타내었는데, BL의 회복률이 엑소좀 첨가군에서 비첨가군보다 더 빠르게 재확장되는 것으로 나타났으며, 그 효율 또한 보다 우수하였다. 극저온에서 살아남는 배아의 품질을 발달 역량 측면에서 분석한 결과, 엑소좀 첨가군은 미첨가군에 비해 보다 높은 PLAC8, IGF1R, OCT4 및 INF-γ의 mRNA 발현량을 갖는 것으로 측정되었다(도 1d). 따라서, 상기의 결과는 엑소좀의 첨가가 Cavity 재팽장 및 부화 속도를 크게 향상시키고, 체외에서 생산된 냉동 생존한 소배아의 발달 능력을 촉진했음을 시사한다.

[0054] 엑소좀의 보충시 소 배아 발달에 영향을 미치는 정도를 측정하기 위해 난모세포수, 수정란수, 분열된 배아수, 총 BL의 수, 재팽창된 BL의 수에 대해 확인하여 나타낸 것이 표 3이다.

표 3

[0056]

그룹	난모세포수 (Oocyte(n))	수정란수 (Speculated zygote(n))	분열된배아수(%) (Cleaved embryos(n))	총 BL수(%) (Total BL(n))	재팽창된 BL수(%) (Expanded BL(n))
엑소좀 미첨가 SOF	649	600	470 (78.3±0.61)	169 (28.2±0.77)	71 (41.8±5.28)
엑소좀 첨가 SOF	608	565	442 (78.06±0.96)	236 (42±1.36)	142 (61.4±2.03)

[0058] 도 2는 BL의 Cavity 팽창율 및 생존율을 나타낸 것이다. 배아 배양 8일까지 엑소 첨가군 및 비첨가군 모두에서 완전한 Cavity 팽창이 되었다. 엑소좀 첨가군과 비첨가군의 Cavity 팽창이 완료된 시점인 8일 후의 총 생존 BL 수 및 팽창된 BL수를 퍼센트로 나타낸 것으로 엑소좀 첨가군의 총 생존 BL은 42±1.36%, 엑소좀 미첨가군의 총 생존 BL은 28.2±0.77%로 나타났다. 또한, BL의 재팽창율은 엑소좀 첨가군은 61.4±2.03%, 미첨가군은 41.8±5.28로 나타났다. 따라서, 본 발명의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 조성물로 구성된 배지 사용 시 동결수정

란의 재팽창율 및 생존의 효율이 미첨가군보다 우수한 것으로 나타났다.

[0060] **<실시예 2> 산화 및 물리적 스트레스 내성 평가**

[0061] 냉동 보존 후 해동시에 배아의 품질을 저하시키는 이유는 산화 및 물리적 스트레스 때문으로 알려져 있다. 엑소좀의 첨가가 냉동 생존 배아의 품질에 미치는 영향을 평가하기 위해, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD2, Superoxide dismutase) 및 글루타티온 퍼옥시다제(GPX4, Glutathione peroxidase)와 같은 항산화 효소의 mRNA 수준 변화를 조사했다.

[0062] Total RNA는 제조업체의 지침에 따라 Arcturus PicoPure RNA 추출 키트(Thermo Fisher, Foster City, CA, USA)를 사용하여 추출되었다. iScript reverse transcriptase(BioRad)를 사용하여 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성했다. qRT-PCR 분석을 위한 상대 정량화는 Cycler BioRad 시스템을 사용하는 SYBR Green 마스터 믹스를 사용했다. 테스트된 모든 유전자의 역치(Ct) 값의 정규화는 GAPDH의 Ct 값으로 수행되었다.

[0063] PCR 증폭 조건은 94℃에서 5분 동안 변성된 Template(템플릿) cDNA, 이어서 94℃로 30초 동안 유지, 각 유전자 특이적 프라이머 어닐링(Annealing) 온도로 30초를 40 cycle(사이클), 그리고 나서 72℃에서 신장(Elongation)되도록 30초로 진행하였다. 음성 대조군은 또한 PCR을 진행하였고, 이 대조군에는 cDNA가 첨가되지 않았다. mRNA 발현 패턴의 분석을 위해, 각 3번씩 실험을 진행하였으며, 실험 세트에서 그룹당 n=5 BL을 사용하였다. qRT-PCR에 사용한 프라이머는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0065]

Gene	Forward	Reverse	Accession
GAPFDH	TTCAACGGCACAGTCAAGG	ACATACTCAGCACCAGCATCAC	NM_001034034
PIAC8	TGAGGACCCTCTACAGGACTCG	TAGAAAGTGCGATTGGCTCTCC	XM_024993443.1
IGF-1R	GATCCCGTGTTCTTCTACGTTC	CAGCCTGCTGCTATTTCTTTTT	NM_001244612.1
OCT4	AGGTGTTCAGCCAAACGACTAT	GTCTCTGCCTTGCATATCTCCT	NM_174580
INF-Tau	CCCCATTCTGACTGTGAAGA	TTTTGCAAGGTGGTTGATGA	AF238612.1
MnSOD2	CGCTGGAGAAGGGTGATGTTAC	GTTTGATGGCTTCCAGCAATTC	NM_201527.2
GPX4	GCACGAATTTTCAGCCAAGG	AAACCACACTCGGCGTATCG	NM_001346431.1
HSP70	CAACGTGCTCATCTTTGATCTG	GTCCTTCTTGTGCTTCCTCTTG	NM_203322.3
HSP90	TGTCTGACGATGAAGACGAGAC	CTCCTTCTCTTTCTGGAACTGC	NM_001035338.2
CD44	CCGGAACATAGGGTTTGAGA	GGTATAACGGGTGCCATCAC	NM_174013.3
CDH1	CCGTGAGAGTTTTCCCACAT	CATTGGTGACTGGGTCTGTG	AY508164.1
CLDN2	CTTTACCTGGGCATTATTTCCTC	AGTTAACTCACTCTTGCCTTTCG	NM_205781.2
CLDN4	GTCATCCGCGACTTCTACAAC	AGTACTTAGCGGAGTAGGGCTTG	NM_001014391.2
OCLN	AATCACTACACACCAAGCAATGAC	AAGCATAGACAGGATCCGAATTAC	NM_001082433.2
ACTINγ2	AAGAGCTACGAGCTGCCAGATG	GCGGATGTCAATGTCACACTTC	BT021005.1
DESM2	CTGAATGACCTCCGGTTTGG	GGAAGGCTGCAGTCATTTGG	NM_001166526.1
AQP3	GTACCTCAATGGGCTTCAACTC	ATCATGAGCTGGTACACGAAGAC	NM_001079794.1
AQP8	CACTGGGACTACCACTGGATCTAC	TCACCGTCCCTTTAGGATTAGAC	NM_001206607.3
AQP9	AACTTCTGGTGGATTCCTGTAGTG	ATATTTCTCTGGTTTGTCCTCTGG	NM_001205833.3
ATP1α1	TATGGACAGATTGGTATGATCCAG	ATCTTCCTCTGTTCATAGGTCCAC	NM_001076798.1

[0067] qRT-PCR 결과 SOD2 및 GPX4의 mRNA 엑소좀 미첨가군의 BL보다 엑소좀이 첨가된 배지에서 배양된 BL의 경우 보다 높은 mRNA 발현량이 높은 것으로 나타났다(도 3a, b). 도 4a, b는 축적된 활성산소(ROS, Reactive Oxygen Species)를 분석한 것이다. 엑소좀 미첨가군에 비해 엑소좀 첨가군에서 역시 낮은 형광 신호를 나타내었다. 따라서, 엑소좀 첨가군은 항산화 효소가 미첨가군에 비해 원활하게 작용되는 것으로 나타났다. 이는 엑소좀 첨가 시 항산화 유전자의 발현이 증가하고 동결 보존 후 미첨가군의 BL은 축적된 ROS에 따라 항산화 활성이 저하된 것으로 보인다.

[0068] 이와 연관되어 엑소좀 첨가군은 비첨가군에 비해 동결-해동 동안에 열충격 관련 단백질(HSP70 및 HSP90)의 상대

적 mRNA 수준이 증가하는 것으로 나타났다(도 3c, d). 상승된 HSP70 및 HSP90의 mRNA 발현량의 증가는 동결보존의 동안 발생한 생리적 스트레스에 기인된 DNA 손상을 줄이는데 기인하는 것으로 나타나며, 이는 세포 사멸 분석 실험을 통해 확인하였다.

[0069] TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay를 위해 In Situ Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 측정하였다. 엑소좀 첨가 및 엑소좀 미첨가군 사용 배지의 해동 후 재팽창된 BL에서 TUNEL 표지된 양성핵을 검출하기 위해 BL을 먼저 PBS/폴리비닐 피롤리돈(PVP) 용액으로 세척하고 4% 파라포름알데히드(PFA)에 15분 동안 고정했다. 고정 후, BL은 실온(RT)에서 30분 동안 0.5%(v/v) Triton X-100 및 0.1%(w/v) 나트륨 시트레이트(Sodium citrate)로 세척하고 투과화(Permeabilization)되었다. 투과화한 후, BL은 예비 조명(Preventive light) 조건에서 1시간 동안 37℃에서 TUNEL 분석 키트 혼합물과 함께 배양하였다. 반응을 멈추기 위해 BL을 PBS/PVP 용액으로 세척하고 각 세포의 핵 검출을 위해 DAPI(5분)로 대비염색했다. 세척된 BL을 유리 슬라이드에 장착하고 이미지를 표면 형광현미경(Olympus IX71, Tokyo, Japan)을 사용하여 기록했다. 개별 BL에서 TUNEL 표지된 사멸한 것(빨강색)은 Image J 소프트웨어(미국 메릴랜드 주 베데스다에 있는 국립 보건원에서 개발)를 사용하여 분석하였다. 평균 백분율은 총 세포 수에서 DAPI로 염색된 것(파란색)의 비중을 계산하였다.

[0070] 도 3e, 도 3f 및 도 3g는 상기의 방법을 사용해 세포 사멸에 대해 분석한 결과와 TUNEL이 표지된 양성핵의 백분율을 정량화한 것을 나타낸 것이다. 이 도면을 살펴보면, 엑소좀 첨가군에서 보다 낮은 세포사멸의 수치를 가졌다. 이와 대조적으로, 엑소좀 미첨가군은 비교적 높은 세포 사멸 수치를 보였다. 상기의 결과를 종합해보면, 배양 배지에 엑소좀을 첨가하면 해동 후 동결 보존된 BL의 항산화 인자 및 열 충격 관련 인자의 발현을 유도함으로써 동결 내성을 향상되는 것임을 알 수 있다.

[0072] 도 5는 극저온에서 엑소 첨가군 및 비첨가군의 지질 대사 유전자의 mRNA 발현에 대해 나타낸 것이다. PPARα는 핵 수용체에 관여하는 유전자로 여러 지방산에 의하여 활성화되며, 간에서 지질단백질과 지방산대사를 조절한다. PPARα의 활성화는 지방산 흡수를 증가시키고 많은 유전자를 유도하는데 지질 결합 단백질, Apolipoprotein, 과산화소체에 관련된 것과 미토콘드리아 지방산 β-산화를 코딩하는 유전자들이 있다(과산화소체 증식제-활성화 수용체(PPAR) α-기대되는 약물학적 표적(Peroxisome Proliferator Activated Receptor(PPAR)-alpha: A pharmacological target with a promising future. RESEAT모니터링 보고서) 또한, 지방산 산화하는 것 외에 간에 있는 아미노산의 대사를 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다. APOA1(Apolipoprotein A1)은 혈액 내에서 지방을 운반하는 복합체 인지방단백질의 단백질 구성성분이다. 지방-단백질의 구조적 골격에 기초가 되며, 심혈관질환과도 밀접한 관련이 있는 인자이다. 또한, CPT(Carnitine Palmitoyl Transferase)1은 미토콘드리아 기질(Matrix)내 트랜스로케이스(Translocase)의 수송에 관여하는 인자로 세포질냉의 사이토졸(Cytosol)에 위치하여 지방산으로부터의 생성물인 아실-CoA(Acyl-CoA)가 CoA(보조효소)를 잠정적으로 탈리하고 카르티닝과 결합하여 미토콘드리아 내부로 이동하도록 기능하는 조절 기전 역할을 하는 인자이다(*Molecular genetics and metabolism*, 2000, 71(1-2), 139-153.).

[0073] 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 조성물을 사용하였을 때, 미첨가군보다 지질대사에 관련한 인자 PPARα, APOA1 및 CPT1이 2 내지 3배 이상으로 유전자 발현량이 증가한 것으로 나타났다.

[0075] **<실시예 3> 영양배엽 상피 및 접합점의 안정도에 대한 평가**

[0076] BL의 형태는 영양배엽 상피의 안 조직의 안정화 정도에 따라 달라진다. 도 6a는 엑소좀을 첨가한 배지를 통해 성장한 BL의 영양배엽 상피 세포에서 세포간 접합 접촉을 안정화하여 포배강의 형태를 유지하는 것에 대한 논리를 모식도로 나타낸 것이다.

[0077] 해동 후 BL의 영양배엽 상피 라이닝(Lining) 특징이 복원되었는지 여부를 확인하기 위해 영양배엽 상피 라이닝에 관여하는 초기영양배엽 유지 마커 CDX2의 발현량을 측정하였다. 이를 위해 엑소좀 첨가군 및 엑소좀 미첨가군으로부터 해동 후 재팽창되거나 부화된 BL을 수집하여 4%(w/v) PFA 용액으로 고정시켜 면역형광법(Immunofluorescence)을 이용하여 영양배엽 상피의 라이닝(Lining) 및 접합점의 온전성에 관련한 인자에 대해 분석하였다. 세포를 PBS/PVP 용액으로 3회 세척하고 0.5% Triton X-100으로 투과시켰다. 세척 후, BL을 차단 용액(PBS/PVP 중 3% BSA)에 실온에서 2시간 이상 방치했다. 차단 후, 세포를 4℃에서 하루 동안 1차 항체(PBS/PVP 용액에 희석)와 함께 배양했다. 연속적인 세척 후, 세포를 FITC 또는 TRITC(PBS/PVP 용액에 희석)와 결합된 2차

항체와 함께 RT에서 1시간 동안 배양했다. PBS/PVP 용액으로 잔존물을 세척하고 DAPI로 핵을 5분 동안 대비 염색했다. 유리 슬라이드에 세척된 BL를 올리고 글리세롤 한 방울을 넣어 커버 글라스로 덮었다. 발현 분석을 위해 공 초점(Confocal) 레이저 현미경(Olympus, FV1000, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 면역형광분석에 사용되는 항체는 표 5에 나타내었다.

표 5

[0079]

타겟	Cat#	제조사
Anti-COX2	B-8434	Sigma
Anti-CD44	ab157107	Abcam
Anti-AQP3	ab153694	Abcam
Anti-ATP1α1	MA3-928	Invitrogen
DAPI	62248	Thermo Fisher Scientific
FITC	B2119	Santa Cruz
TRITC	A6071	Invitrogen

[0081] 면역형광분석은 엑소좀을 첨가한 것에서 CDX2 발현이 재증가 되었고, 부화된 BL에서도 전체 영양배엽 세포 라이닝 주위에 균일하게 발현되는 것으로 나타났다. 이와 대조적으로, 엑소좀 미첨가군에서는 BL의 동결 후 생존율이 감소하고 CDX2의 발현량 또한 낮은 수치를 나타냈다(도 6b, c). 이러한 결과는 배양 배지에서의 엑소좀 첨가 시 CDX2 발현을 유도함으로써 재팽창된 포배강내 영양배엽의 상피 라이닝(Lining)을 능동적으로 안정화 시키는 것을 시사한다. 엑소좀을 첨가함으로써 동결 및 해동 중에 영양배엽 상피의 세포가 상피세포가 서로 단단히 부착되지 않은 까닭에 세포가 손상되지 않을 수 있어 해동 후에도 영양배엽의 상피세포의 형태를 복구할 수 있는 것으로 판단된다. 상기의 추정을 확인하기 위하여 세포 부착 접합 마커인 CD44 및 Cadherin(CDH1)의 발현량을 조사하였다. 대조군에 비해 엑소좀 첨가군의 BL에서 CD44 및 CDH1의 더 높은 mRNA의 발현이 측정되었다(도 6d).

[0082] 도 6e, f는 엑소좀 첨가군 및 엑소좀 비첨가군의 CD44 및 CDH1에 대한 이미지 사진과 이를 분석한 것을 나타낸 것이다. 엑소좀 첨가군의 영양배엽 상피 세포 주변에 연속적인 띠 모양으로 발현되는 것으로 나타났으며(도 6e), 엑소좀 미첨가군 BL에 비해 엑소좀 첨가군을 사용한 BL에서 세포 사이에서 CD44의 형광 발현이 보다 많은 양이 검출되었다(도 6f). 상기의 실험 결과는 엑소좀의 첨가로 인해 세포간의 접합 유전자 발현에 영향을 주어 해동 후 접합부 연결을 강화하여 포배강의 재팽창시에도 매끄러운 상피 라이닝(Lining)을 갖는 것으로 나타났다.

[0084] **<실시예 4> TJ 복합체 안정성 평가**

[0085] 기능성 TJ 복합체(TJ complexes)를 통한 세포 외 장벽의 형성은 팽창된 BL의 영양배엽 상피 라이닝(Lining)에 있어서 중요한 또 하나의 인자이다. 이러한 복합체의 기능 또는 형태가 냉동 보존 과정의 동결 및 해동 동안 손상된다. 따라서, 엑소좀의 첨가에 따라 TJ 복합체 관련 인자인 Claudin family(CLDN2, CLDN4), Occludin(OCLN), Actinγ2 및 Desmocolin-2(DES2)의 mRNA 발현량을 측정하여 대조군과 비교하였다. qRT-PCR 분석은 엑소좀 첨가 없이 배양된 BL에 비해 엑소좀 첨가군에서 TJ 유전자의 mRNA 발현량이 보다 높은 수준으로 나타났다(도 7a).

[0086] TJ 복합체 관련 유전자의 발현의 감소가 세포 외 장벽을 불안정하게 하여 BL의 재팽창의 지연의 원인이 되었다. 또한, 우리는 4 kDa FITC-dextran을 사용하여 TJ의 세포외 투과막(Permeability barrier of TJs)을 분석하였다.

[0087] 보호된 조명 조건에서 10분 동안 RT로 엑소좀 첨가군 및 엑소좀 미첨가군의 해동 후 24 시간째 재팽창된 BL 군을 수집하고 각각의 배양 배지에서 1 mg/mL 4 kDa FITC-dextran(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)과 함께 배양했다. 그 후, BL은 즉시 세척하고, 표면 형광 현미경(Olympus, IX71, Tokyo, Japan)으로 Blastocoel 내의 형광 강도의 존재에 의해 밀착 접합 투과성을 시각화하였다. 그런 다음 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정된 수치를 정량화했다.

[0088] 4 kDa FITC-dextran 분석 결과 엑소좀이 첨가된 BL은 22%로 대조군은 60%에 비해 낮은 투과율을 보였다(도 7b, c). 즉, BL의 TJ 복합체의 기능이 동결시에 손상되지만 엑소좀을 첨가함으로써 TJ 복합체의 유전자의 발현을 상향 조절하여 재팽창된 BL의 복구를 유도하는 것으로 나타났다.

[0090] **<실시예 5> 세포간 삼투압 균형 평가**

[0091] TJ 복합체 기여 외에도, 세포간 이온 및 H_2O이동의 유지는 팽창된 BL 비공간의 유체 축적에 중요하다. 엑소좀 첨가군 및 비첨가군의 BL에서 H_2O채널 조절인자 AQP 및 이온 구배에 관여하는 인자 Na^+/K^+-ATPase α1(ATP1α1)의 mRNA의 발현량을 측정하여 나타낸 것이 도 8a이다. qRT-PCR 결과 엑소좀 첨가군에서 AQP3, AQP8 및 AQP9의 발현이 유의하게 상향 조절된 반면, ATP1α1은 미첨가군에 비해 하향 조절되는 것으로 나타났다.

[0092] 신생 BL의 영양배엽 상피 내벽에 다량 분포하는 것으로 관찰된 유압 게이트 단백질 AQP3의 발현을 측정하여 나타낸 것이 도 8b이다. AQP3 발현량의 증가는 유체 축적과 관련이 있으며, 상기의 BL의 재팽창 및 부화율의 분석 결과와 상응되게 나타났다.

[0093] 도 8c, d의 이미지 분석은 AQP3가 엑소좀 첨가군과 비첨가군 BL의 AQP3 영양배엽 상피 라이닝(Lining)의 차이를 비교하여 나타낸 도이다. 도 8c, d를 보면, AQP3의 발현이 엑소좀 첨가군에서 보다 많은 양을 갖는 것으로 나타났다.

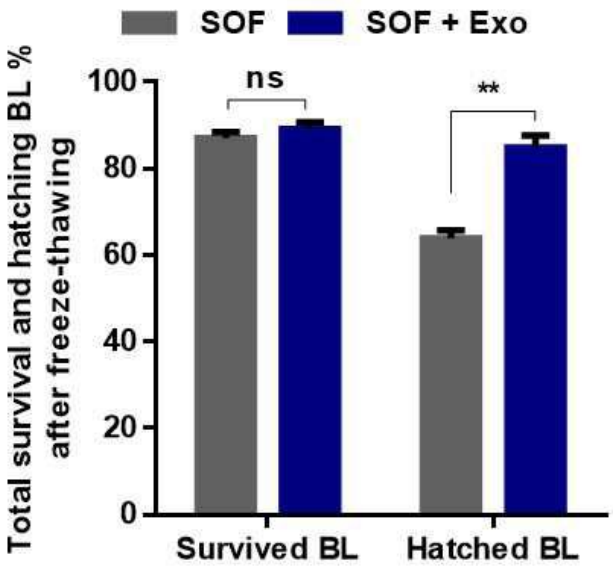
[0094] 또한, ATP1α1의 면역 형광 분석에서도 qRT-PCR결과와 유사하게 엑소좀 첨가군이 비첨가군보다 감소하는 것으로 나타났다(도 8e).

[0095] 형광 분석 결과를 그래프로 나타낸 것이 도 8f이다. 그래프에도 나타나 있듯이 엑소좀 첨가군의 BL은 이온이 과잉 축적되는 것을 방지하여 삼투 흐름의 균형적이고, BL 재팽창 및 부화 중에 내부 유체 이동이 원활한 것으로 나타났다.

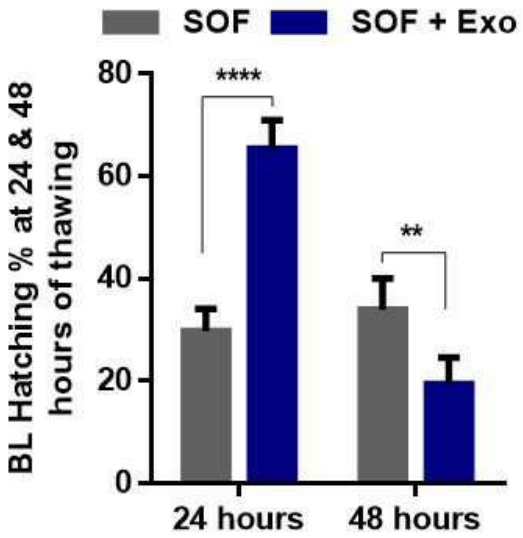
[0098] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

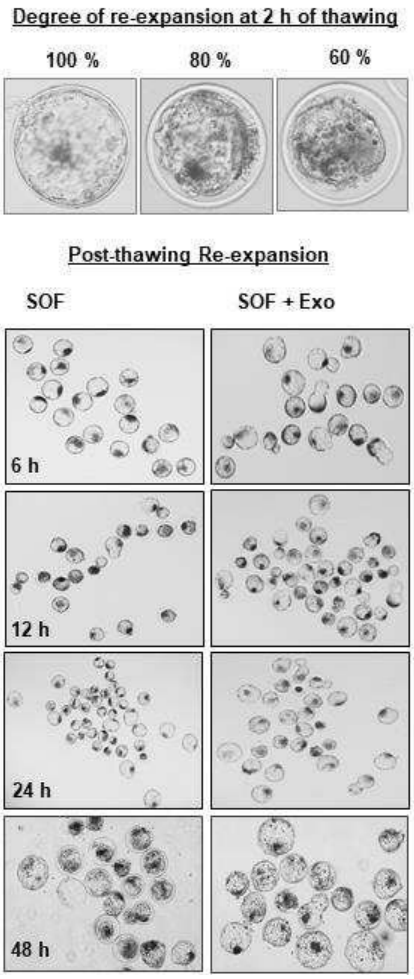
도면1a


SOF
SOF + Exo
Total survival and hatching BL % after freeze-thawing
100
80
60
40
20
0
ns
**
Survived BL
Hatched BL

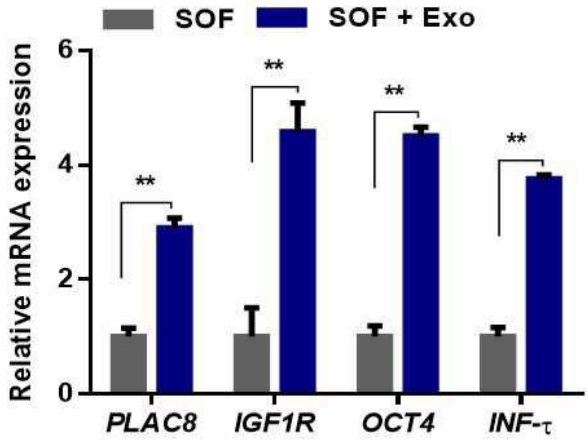
도면1b


SOF
SOF + Exo
BL Hatching % at 24 & 48 hours of thawing
80
60
40
20
0
****
**
24 hours
48 hours

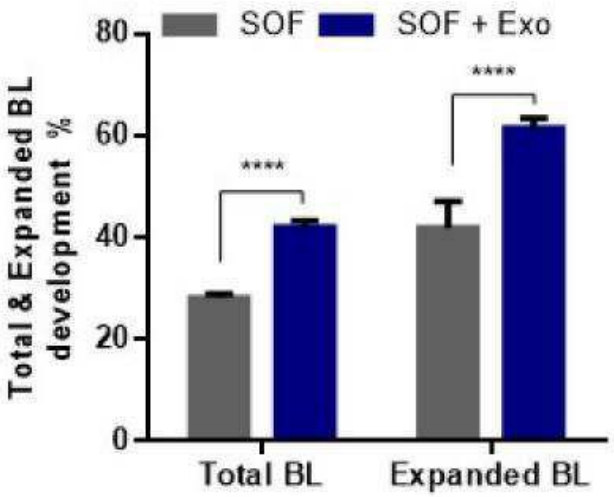
도면1c


Degree of re-expansion at 2 h of thawing
100 %
80 %
60 %
Post-thawing Re-expansion
SOF
SOF + Exo
6 h
12 h
24 h
48 h

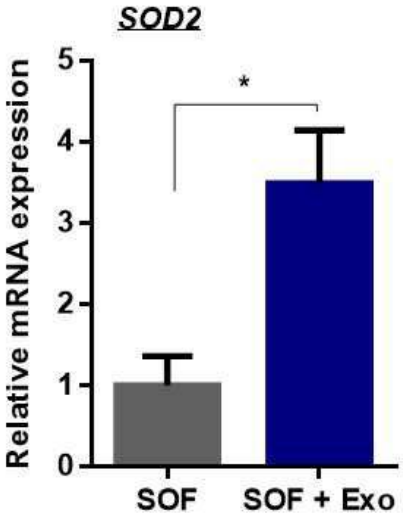
도면1d


SOF
SOF + Exo
Relative mRNA expression
0
2
4
6
**
**
**
**
PLAC8
IGF1R
OCT4
INF-τ

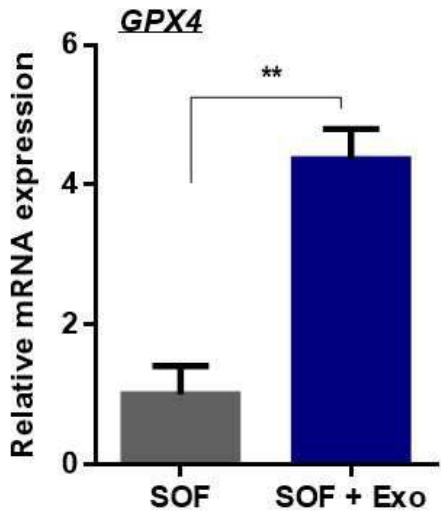
도면2


SOF
SOF + Exo
Total & Expanded BL development %
80
60
40
20
0
****
****
Total BL
Expanded BL

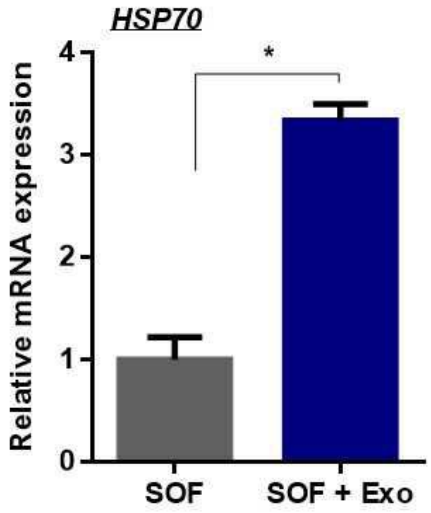
도면3a


SOD2
Relative mRNA expression
5
4
3
2
1
0
*
SOF
SOF + Exo

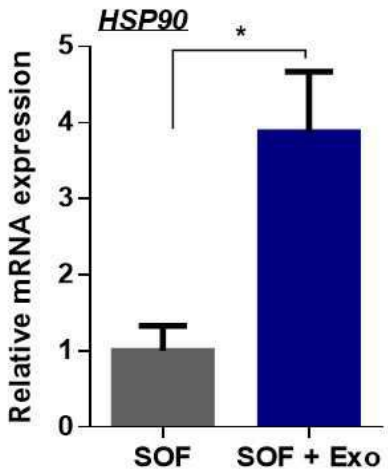
도면3b


GPX4
Relative mRNA expression
6
4
2
0
**
SOF
SOF + Exo

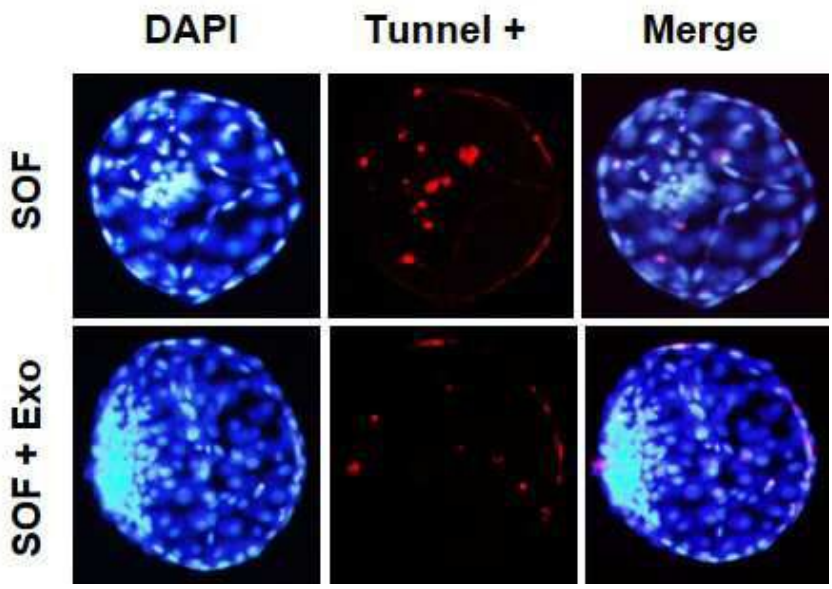
도면3c


HSP70
Relative mRNA expression
4
3
2
1
0
*
SOF
SOF + Exo

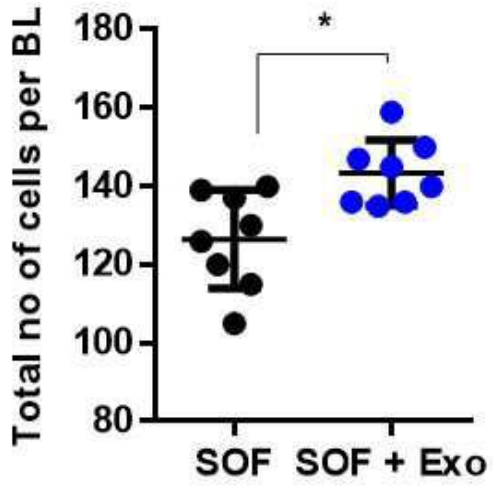
도면3d


HSP90
*
Relative mRNA expression
5
4
3
2
1
0
SOF
SOF + Exo

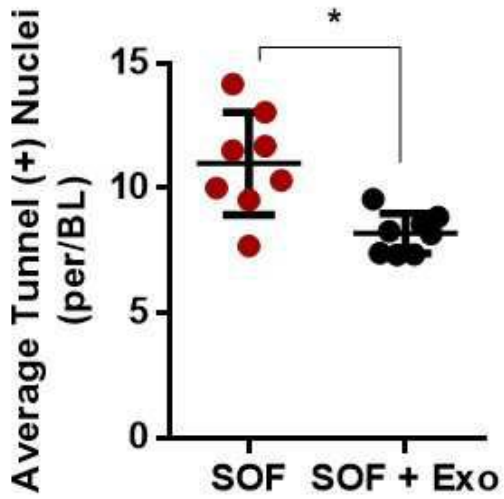
도면3e


DAPI
Tunnel +
Merge
SOF
SOF + Exo

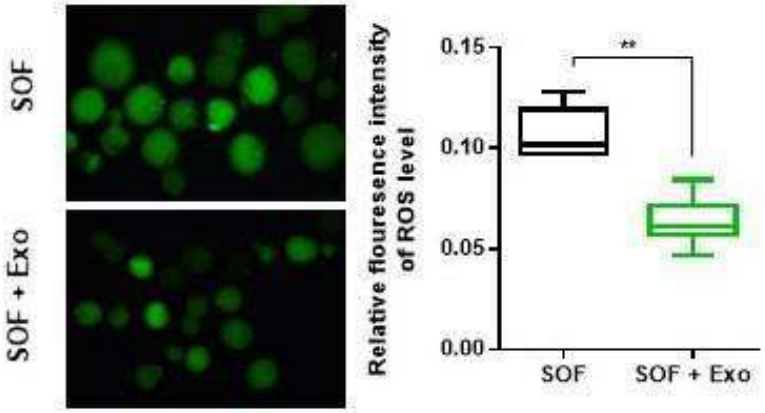
도면3f



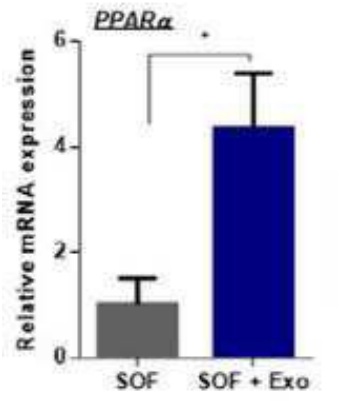
도면3g



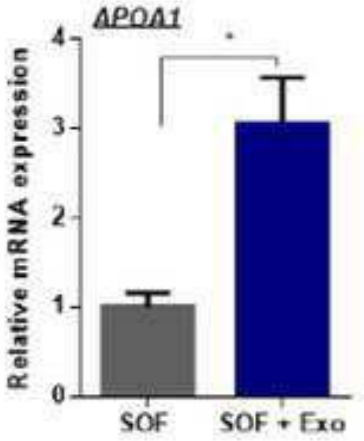
도면4



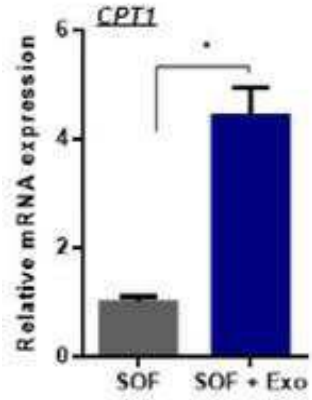
도면5a



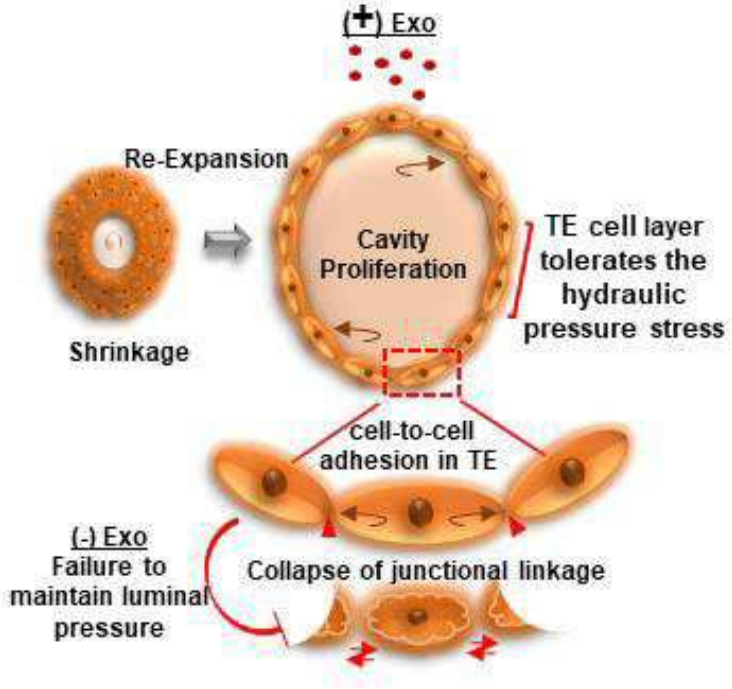
도면5b



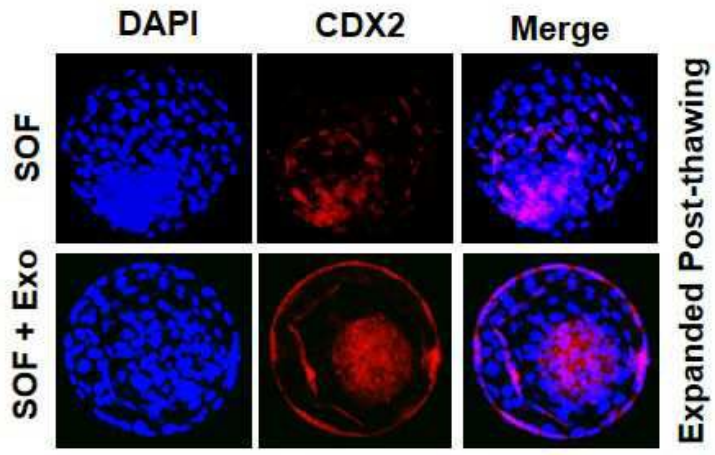
도면5c



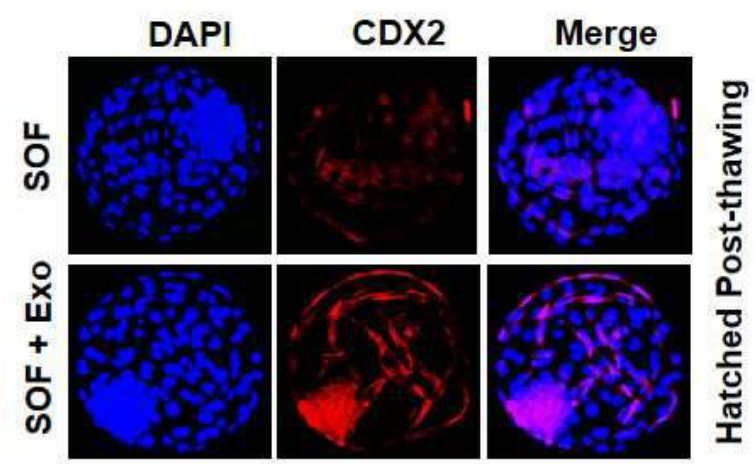
도면6a


(+) Exo
Re-Expansion
Cavity Proliferation
TE cell layer tolerates the hydraulic pressure stress
Shrinkage
cell-to-cell adhesion in TE
(-) Exo
Failure to maintain luminal pressure
Collapse of junctional linkage

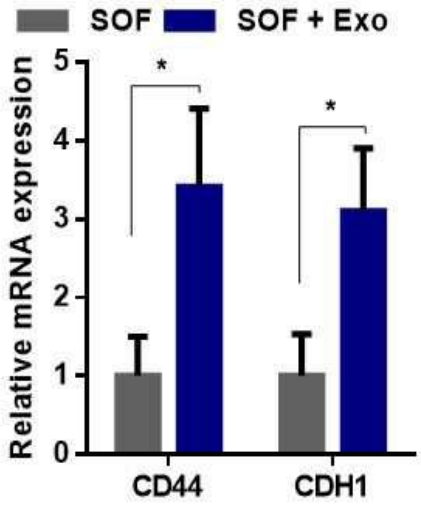
도면6b


DAPI
CDX2
Merge
SOF
SOF + Exo
Expanded Post-thawing

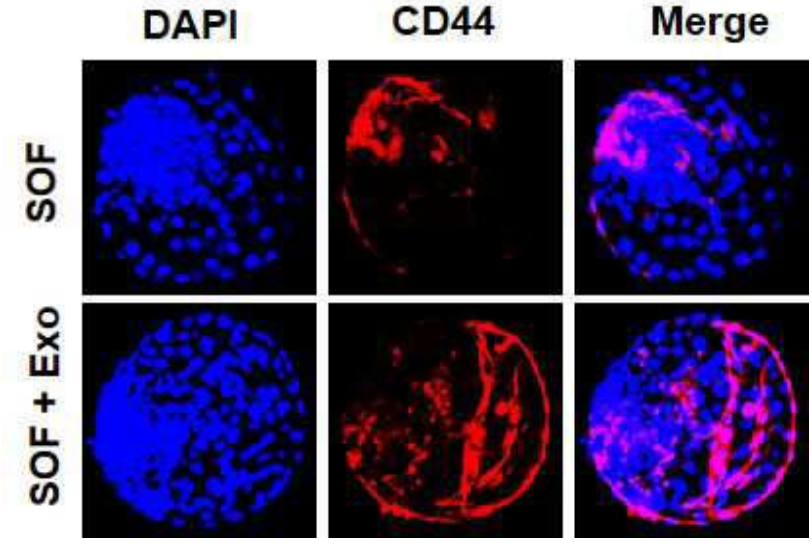
도면6c



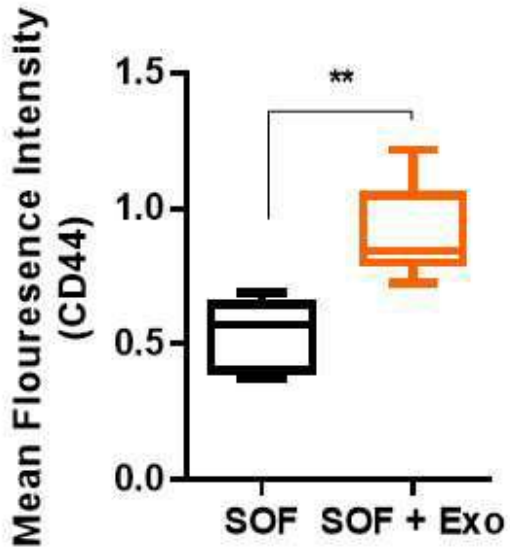
도면6d



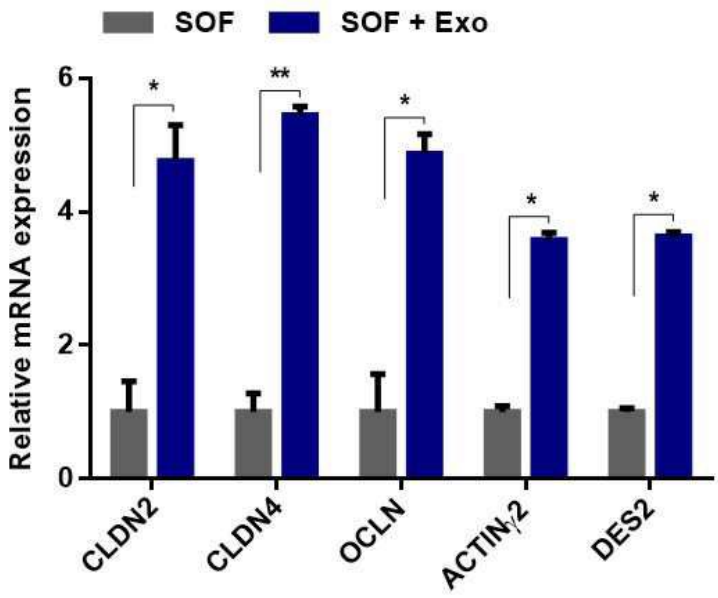
도면6e



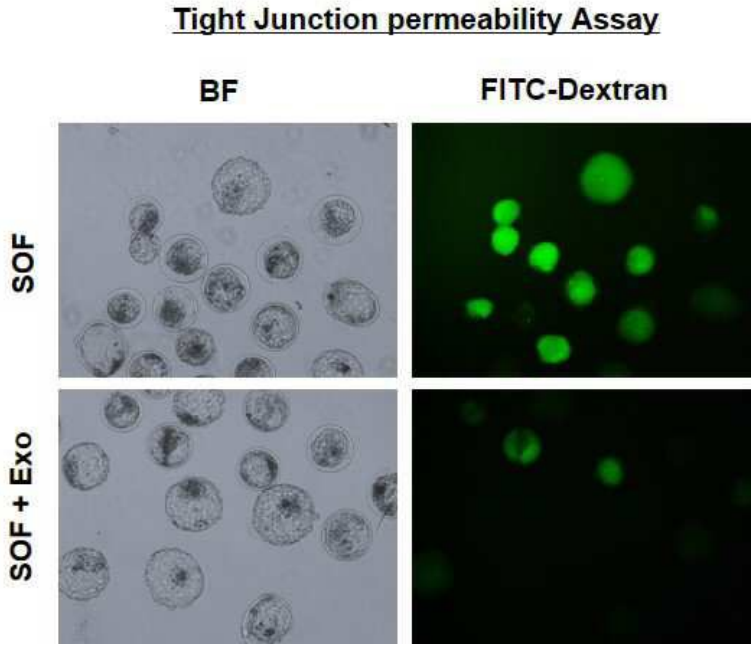
도면6f


Mean Flouresence Intensity (CD44)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
SOF
SOF + Exo

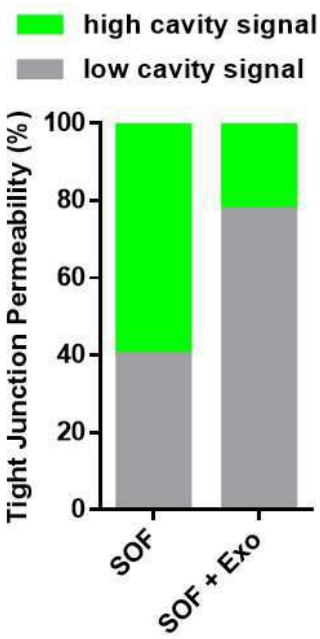
도면7a


SOF
SOF + Exo
Relative mRNA expression
6
4
2
0
*
**
*
*
*
CLDN2
CLDN4
OCLN
ACTINγ2
DES2

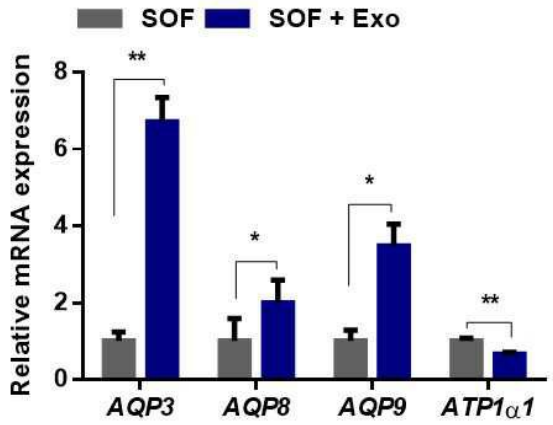
도면7b


Tight Junction permeability Assay
BF
FITC-Dextran
SOF
SOF + Exo

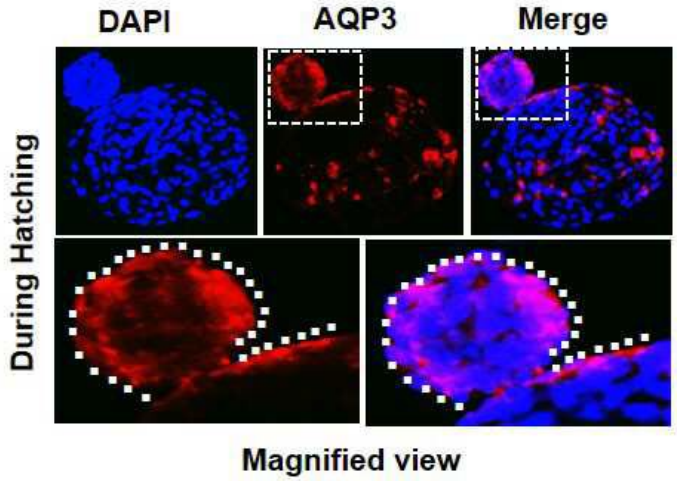
도면7c


high cavity signal
low cavity signal
Tight Junction Permeability (%)
100
80
60
40
20
0
SOF
SOF + Exo

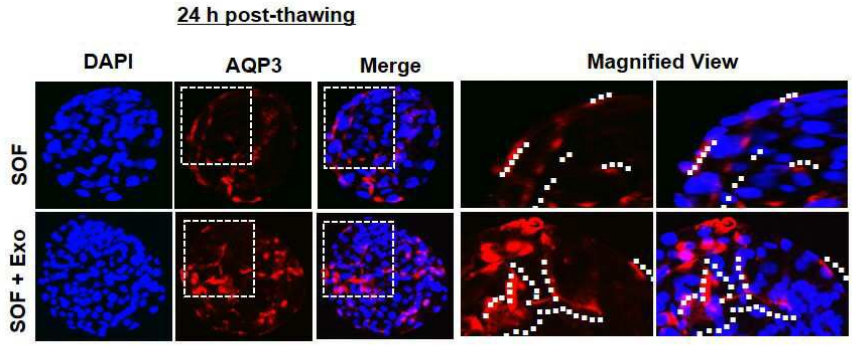
도면8a



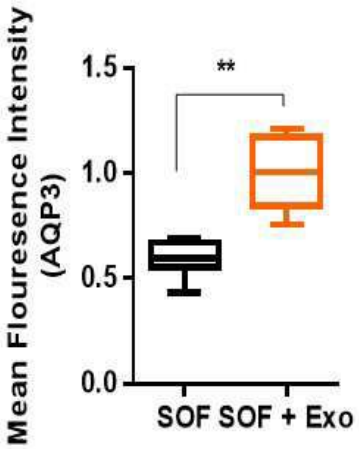
도면8b



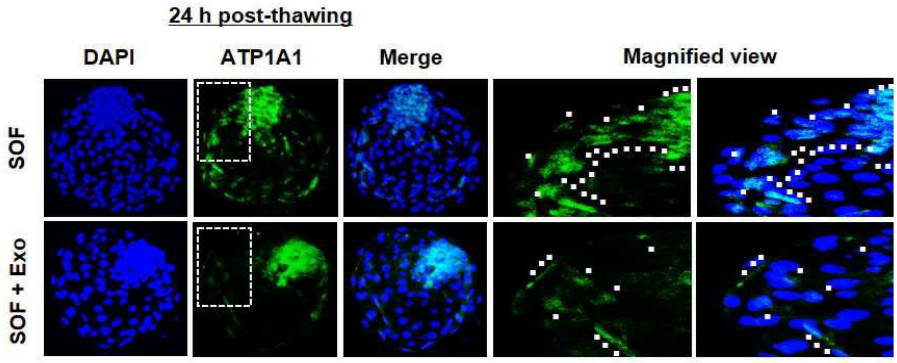
도면8c



도면8d



도면8e



도면8f

