



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025456
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/545 (2014.01) A61K 8/98 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/545 (2013.01)
A61K 8/981 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0102836

(22) 출원일자 2018년08월30일

심사청구일자 2018년08월30일

(71) 출원인

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

박주현

강원도 춘천시 퇴계로 242 퇴계주공4단지아파트
411동 404호

이원중

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
102동 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

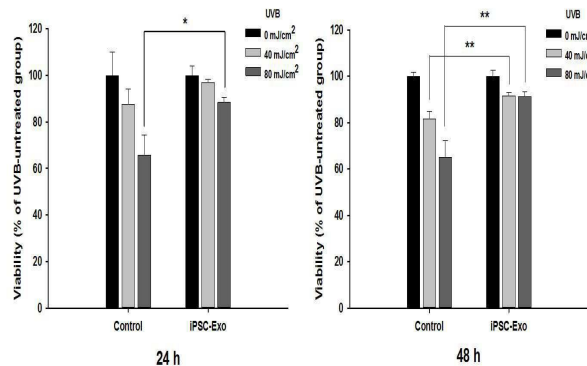
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 피부 재생 및 노화 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소솜을 포함하는 피부 노화 개선 및 피부 재생용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 엑소솜은 피부 노화의 치료를 위한 임상적인 적용의 가능성이 있다.

대표도 - 도4



(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

C12N 5/0625 (2013.01)

C12N 2500/84 (2013.01)

C12N 2501/00 (2013.01)

(72) 발명자

오명식

대전광역시 유성구 계룡로 84, 1527호 (복명동, 레
자미3차)

이진희

인천광역시 남동구 소래역로 119, 805동 701호 (휴
먼시아동산마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1C1B6007644

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 인간 유도만능줄기세포 유래 세포 외 소낭의 대량 생산 및 피부 질환에의 응용

기 여 율 40/100

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9C6031798

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 골세포 직접교차분화를 위한 세포 투과 재조합 단백질 개발

기 여 율 30/100

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A5A1010148

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 30/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 피부 노화 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 엑소좀은 평균 직경 85.8 nm인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 엑소좀은 평균 제타 포텐셜이 - 15.6 mV인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물에서 상기 엑소좀은 3×10^8 내지 5×10^9 입자/ml 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 노화는 광노화 또는 자연 노화인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 피부 재생용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 엑소좀은 평균 직경 85.8 nm인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 엑소좀은 평균 제타 포텐셜이 - 15.6 mV인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 조성물에서 상기 엑소좀은 3×10^8 내지 5×10^9 입자/ml 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 인 비트로에서 섬유아세포의 증식 및 이동을 촉진시키는 방법.

청구항 11

인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 자외선 처리된 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 엑소좀 미처리 세포와 비교하여 인 비트로에서 엑소좀 처리된 세포에서 콜라겐 타입 I의 전사체 레벨을 증가시키고, 매트릭스메탈로프로티나제(MMP)-1 및 MMP-3의 발현 수준을 감소시키는 방법.

청구항 12

인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 자외선 처리된 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 엑소좀 미처리 세포와 비교하여 인 비트로에서 엑소좀 처리된 세포에서 노화 관련 베타 갈락토시데이즈(Senescence-associated- β -galactosidase)의 발현을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 피부 재생 및 노화 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대인들의 생활수준 향상과 더불어 노령인구가 증가함에 따라 노화방지, 주름개선, 미백, 자외선차단 등과 관련된 기능성 화장품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있는 추세이다. 그러나, 기초 화장품 또는 기능성 화장품은 대부분 화학물질로 제조되기 때문에 인체에 대한 안정성 문제가 꾸준히 제기되었다. 이에 따라, 천연, 유기농 원료를 함유한 제품에 대한 관심이 증가하고 있으며, 관련 제품의 시장 규모 또한 증가하고 있다.

[0003] 예컨대, 인간 배아줄기세포 배양액을 포함하는 피부 상태 개선용 화장료 조성물(한국 공개특허 10-2015-0039343), 포유동물에서 유래한 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 피부주름개선용 또는 피부노화억제용 화장료 조성물(한국 등록특허 10-1063299) 등이 개발된 바 있으나, 인간 배아줄기세포를 이용한다는 점에서 윤리적인 문제가 있었으며, 그의 효과가 미미하다는 문제점 등이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 피부 노화를 치료하는 신규한 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 목적은 피부 노화를 치료하는 신규한 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 피부 노화 개선용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 엑소좀은 평균 직경 85.8 nm인 것이 바람직하고, 평균 제타 포텐셜이 -15.6 mV인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0008] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물에서 상기 엑소좀은 3×10^8 내지 5×10^9 입자/ml 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 노화는 광노화 또는 자연 노화인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010] 또 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 피부 재생용 조성물을 제공한다.

[0011] 또 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 인 비트로에서 섬유아세포의 증식 및 이동을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0012] 또 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 자외선 처리된 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 엑소좀 미처리 세포와 비교하여 인 비트로에서 엑소좀 처리된 세포에서 콜라겐 타입 I의 전사체 레벨을 증가시키고, 매트릭스메탈로프로테이네이즈(MMP)-1 및 MMP-3의 발현 수준은 감소시키는 방법을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 인간 유도만능줄기세포 유래 엑소좀을 자외선 처리된 인간 피부 섬유아세포에 처리하여 엑소좀 미처리 세포와 비교하여 인 비트로에서 엑소좀 처리된 세포에서 노화 관련 베타 갈락토시데이즈(Senescence-associated- β -galactosidase)의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0014] 따라서, 본 발명에 따른 엑소좀은 피부 상태 개선용 화장료 조성물, 피부 상태 개선용 의약품 조성물, 피부 도포용 조성물, 또는 상처치유용 약학 조성물에 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0015] 여기서, "피부 상태 개선"이란, 피부 재생, 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는

개선, 모발 성장 및/또는 축소된 모낭 복원일 수 있다.

- [0016] 이때, "개선"이란, 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0017] 한편, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 향수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 상기 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [0020] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 에센스, 물, 글리세린, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 글리세린, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 화장료 조성물에서, 상기 엑소솜은 상기 화장료 조성물 총 중량의 0.0001 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 더욱 구체적으로 0.0005 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 엑소솜이 상기 범위 내로 포함될 때, 우수한 피부 상태 개선 효능을 나타내는 이점이 있으며, 조성물의 제형이 안정화되는 이점이 있다.
- [0026] 여기서, "의약외품"이란, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중에서 의약품보다 작용이 경미하거나 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것을 의미한다. 사람이나 동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0027] 본 발명의 상기 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] "피부 도포용 조성물" 또는 "상처치유용 조성물"[0073] 은 약학 조성물일 수 있다.

- [0029] 따라서, 약학 조성물의 경우, 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 것에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 투여 시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용될 수 있는 것을 의미한다.
- [0031] 투여량은 피부 상태 개선을 위해 약학적으로 유효한 양일 수 있다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질환의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 이에 제한되지 않으나 구체적인 예로, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0033] 또한, 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 피부 상태 개선 방법에서, 상기 조성물은 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용하여 투여될 수 있으며, 상기 조성물을 피부에 도포하거나 분무하는 방법 또한 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0036] 본 발명자들은 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, 이하 'iPSC'라 함) 조건 배지(condition medium, 이하 'CM'이라 함)로부터 엑소좀을 분리하고 인간 피부 섬유아세포(이하, 'HDFs'라 함)에서 증식 및 이동 뿐만 아니라 노화 관련된 세포 반응에 대한 효과를 조사하였다. 광노화 및 자연 노화를 유도하기 위하여 HDFs를 각각 UVB 조사 또는 서브 킬처하고 연속 계대하였다. 그 다음 본 발명자들은 iPSC-Exo의 보호 효과를 UVB 조사 유도된 세포 손상에 대하여 조사하였다. 또, 본 발명자들은 iPSC-Exo의 효과를 각각 UVB 유도 및 자연 노화된 HDF에서 ECM 구축에 중요한 MMP-1, 3 및 collagen type I의 발현에 대하여 조사하였다.
- [0037] 인간 iPSCs 유래된 엑소좀의 특징
- [0038] 인간 iPSCs로부터 분리된 엑소좀은 실시예에 기재된 것과 같이 ExoQuick-TC™ 용액을 사용하여 분리하고 크기 및 형태로 특성화하였다. 본 발명자들은 엑소좀 수 및 그들의 크기 프로파일을 평가하기 위하여 나노입자 트래킹 분석(nanoparticle tracking analysis; NTA)을 이용하였다. NTA 결과는 iPSC-Exo의 크기 분포는 비록 소수의 더 큰 소낭(vesicle)을 포함하지만 주된 피크가 ~ 100 nm이고 평균 지름이 85.8 nm를 나타내었다(도 1A). 이 결과는 다른 미세소낭(microvesicles) 또는 아포토틱 바디(apoptotic bodies)들의 크기는 엑소좀 보다 상대적으로 크기 때문에 본 발명에 사용된 대부분의 세포의 소낭이 엑소좀이라는 것을 나타낸다. TEM(Transmission electron microscopy) 이미지들은 iPSC-Exo의 구형 막 구조를 나타내는 NTA 결과와 유사한 경향을 나타내었다(도 1B). 또한 동적 광산란(dynamic light scattering; DLS) 결과들은 분리된 iPSC-Exo의 평균 제타 포텐셜은 -15.6 mV이라는 것을 나타내었다(도 1C).
- [0040] HDFs의 증식과 이동은 iPSC-Exo에 의하여 가속됨
- [0041] 본 발명자들은 iPSC-Exo의 HDFs의 증식 및 이동에 대한 효과를 조사하였다. 미토겐(mitogenic) 효과를 3에서 315×10^8 particles/mL의 범위의 여러 용량의 iPSC-Exo로 MTT 어세이로 분석하였다. HDFs의 증식은 iPSC-Exo에 의하여 용량 의존적으로 50×10^8 particles/mL까지 증가하고 더 높은 농도에서는 유지되었다(도 2). 그러나 iPSC-Exo를 높은 농도로 처리하여도 독성 효과는 관찰되지 않았다. 비록 미토겐 효과가 50×10^8 particles/mL까지 포화되었으나, 본 발명자들은 큰 차이가 없어서 iPSC-Exo를 20×10^8 particles/mL로 이후 실험에 사용하

였다. iPSC-Exo의 HDFs의 이동에 대한 효과를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 스크래치 운드(scratch wound) 어세이를 수행하였다. 세포 이동에 대한 상승 효과를 이 어세이에서 스크래치된 면적의 클로저(closure)를 평가하여 결정하였다. 도 3A에 나타난 것과 같이, iPSC-Exo로 처리된 HDF에서 갭-필링(gap-filling)의 속도는 대조군보다 현저하게 높았고 이것은 iPSC-Exo이 HDFs의 이동을 촉진한다는 것을 나타낸다. 이동 촉진 효과는 트랜스웰 이동 어세이에서도 나타났다. 세포들을 다공성 막의 상부면에 시딩할 때, 그들은 막을 통과하여 반대편으로 이동하였다. 막의 바닥면으로 이동한 HDFs를 crystal violet으로 염색하고 세포내 crystal violet를 초산 용액으로 녹인 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다. 비주어진 부분(Bright field) 이미지들은 이동된 세포의 수가 iPSC-Exo의 처리에 의하여 크게 증가하였다는 것을 나타낸다(도 3B). 정량적 분석의 결과들은 정량 분석 iPSC-Exo의 HDFs의 이동에 대한 상승 효과를 나타낸다(도 3C).

[0043] UVB-유도된 HDFs 손상에 대한 iPSC-Exo의 효과

[0044] iPSC-Exo이 UVB 조사에 의하여 유도된 손상으로부터 HDFs를 구조할 수 있는지를 조사하기 위하여 세포를 20×10^8 particles/mL의 iPSC-Exo로 UVB 조사 전에 처리하였다. iPSC-Exo가 원형질막을 통과하여 UVB 조사에 의하여 야기된 세포 신호 전달을 매개하는데 시간이 필요하기 때문에 iPSC-Exo의 UVB 조사 후의 처리는 현저한 재생 효과를 나타내지 못할 것으로 생각되었다. 세포들을 40 mJ/cm^2 UVB로 조사할 때, UVB 조사 24시간 후 차이는 비록 iPSC-Exo-처리 군에서 약간 높은 생존율을 나타내었지만 통계적으로 유의하지 않았다($0.05 < P < 0.1$). 그러나 세포를 80 mJ/cm^2 UVB로 조사한 경우, 비처리된 군의 생존율은 $65.6 \pm 8.6\%$ 으로 크게 감소한 반면, while the iPSC-Exo-처리 군은 $88.4 \pm 2.1\%$ 의 생존율을 나타내었다(도 4). UVB 조사 48시간 후, iPSC-Exo의 UVB-유도된 세포 손상에 대한 효과는 세포를 40 mJ/cm^2 , 및 80 mJ/cm^2 UVB로 조사된 세포들에서 명확하게 나타내었다. 이 결과들은 iPSC-Exo이 UV-유도된 광노화로부터 피부 세포를 보호할 수 있다는 것을 시사한다.

[0046] MMP-1, MMP-3 및 Collagen type I의 mRNA 레벨에서 발현에 대한 iPSC-Exo의 효과

[0047] Collagen type I은 진피에 풍부하고 피부 조직의 인장 강도에 관여한다. MMPs는 구조적으로 연관된 matrix-degrading 분해 효소이다. 본 발명자들은 광노화에 관련된 유전자들의 mRNA 발현에 대한 iPSC-Exo의 효과를 조사하였다. HDFs의 UVB 조사 후, MMP-1, MMP-3, 및 collagen type I mRNA의 레벨을 qPCR(quantitative real-time PCR)를 사용하여 평가하였다. UVB 조사(80 mJ/cm^2)는 MMP-1 및 MMP-3의 mRNA 발현을 각각 7.6 ± 0.7 및 7.3 ± 0.3 배 증가시켰다. 반면, collagen type I의 mRNA 발현은 UVB 조사로 $68.3 \pm 0.5\%$ 감소하였다. 그러나, iPSC-Exo 처리가 피부 진피의 주요 구성요소인 collagen type I의 전사체 레벨을 현저하게 증가시켰다는 것을 명확하게 나타내었다(도 5A). 반면, matrix-분해 효소인 MMP-1 및 MMP-3의 발현 수준은 미처리된 그룹과 비교하여 iPSC-Exo 처리된 HDFs에서 감소하였다(도 5B 및 5C). 이 결과들은 iPSC-Exo이 피부 섬유아세포에서 UV 조사에 의하여 손상된 mRNA 발현을 회복하는 것을 시사한다.

[0048] iPSC-Exo은 HDFs에서 노화 관련된 유전자 발현을 역전시킨다

[0049] 본 발명자들은 iPSC-Exo이 자연적으로 노화된 HDFs에서 유전자 발현의 변화를 회복할 수 있는지를 조사하였다. SA- β -Gal은 노화 섬유아세포에서 발현되는 전형적인 바이오마커이다. 도 6A는 SA- β -Gal의 발현이 젊은 HDFs (계대 수 5)와 비교하여 노화된 HDFs (계대 수 31)에서 더 높았다는 것을 나타낸다. 그러나, iPSC-Exo의 처리는 SA- β -Gal-양성 세포의 수를 현저하게 감소시켰다. 정량 분석을 위하여, 세포를 세 그룹으로 분류하였다: SA- β -Gal의 발현에 따라 염색안된, 약하게 염색된 및 강하게 염색된, 그 후에 각 그룹에서 세포의 수를 세 다른 이미지로부터 계수하였다. 결론적으로, SA- β -Gal-양성 세포의 비율을 미처리된 노화 세포와 비교하여 iPSC-Exo으로 처리된 세포에서 감소하였다(도 6B). 다음, 본 발명자들은 iPSC-Exo의 노화된 HDFs에서 ECM 구축과 관련된 유전자 발현에 대한 효과를 조사하였다. 광노화의 경우와 같이, MMP-1, -3의 mRNA 발현 레벨은 증가하였고, iPSC-Exo은 matrix-분해 효소의 발현을 현저하게 감소시켰다. 반면, collagen type I mRNA는 노화된 HDFs에서 감소하였고, 이것은 iPSC-Exo의 처리를 통하여 완전하게 회복되었다(도 7).

[0050] 본 발명에 사용된 용어의 약자의 full name은 아래 표와 같다.

표 1

[0051]

iPSC	Induced pluripotent stem cell
HDF	Human dermal fibroblast
qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
MMP	Matrix metalloproteinase
PDGF	Platelet-derived growth factor
MAPK/ECM	Mitogen-activated protein kinase
ECM	Extracellular matrix
CM	Conditioned medium
TGF- β	Transforming growth factor- β
MSC	Mesenchymal stem cell
hDSPC	Human dermal stem/progenitor cell
UVB	Ultraviolet B
iPSC-CM	Induced pluripotent stem cell-derived conditioned medium
iPSC-Exo	Induced pluripotent stem cell-derived exosomes
SA- β -Gal	Senescence-associated- β -galactosidase
NTA	Nanoparticle tracking analysis
TEM	Transmission electron microscopy
DLS	Dynamic light scattering
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffered saline
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
lncRNA	Long non-coding RNA

발명의 효과

[0052]

본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 인간 iPSC-Exo는 광노화 및 자연 노화에 의하여 손상된 인간 피부에 대한 유리한 효과를 나타내어서, 피부 노화의 치료를 위한 임상적인 적용의 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0053]

도 1은 iPSC-Exo의 특징을 나타낸 그림. (A) iPSC-Exo의 NTA 결과. iPSC-Exo의 평균 직경은 85.8 nm. (B) iPSC-Exo 형태의 TEM 이미지 (스케일 바 = 100 nm). (C) iPSC-Exo에 대한 DLS 데이터. iPSC-Exo의 평균 제타 포텐셜 값은 -15.6 mV.

도 2는 HDFs의 증식에 대한 비록 iPSC-Exo의 효과를 나타낸 그림. 혈청 결핍된 HDFs를 iPSC-Exo로 48시간 처리 후 생존 HDFs의 군을 MTT 어세이로 결정. iPSC-Exo-비처리된 그룹의 전체 군(population)을 100% 하여 다른 그룹의 군들(populations)을 상대값으로 평가하였다. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 은 iPSC-Exo-비처리된 그룹과 비교. 여러 바는 싱글 대표적인 실험에서 3회 반복 샘플의 표준 편차를 나타냄.

도 3은 iPSC-Exo이 HDFs의 이동을 촉진한다는 것을 나타내는 그림, (A) iPSC-Exo으로 처리된 HDF에 대한 스크래치 운드 어세이. 대표 이미지는 iPSC-Exo-처리된 HDFs가 스크래치된 면적으로 더 빠르게 이동하는 것을 나타낸다. (B) HDFs의 이동에 대한 트랜스웰 어세이의 대표적인 그림. (C) 트랜스웰 어세이의 정량 분석. 염색된. crystal violet의 양을 560 nm 흡광도에서 측정. iPSC-Exo-미처리 그룹과 비교한 $***P < 0.001$. 여러 바는 싱글 대표적인 실험에서 3회 반복 샘플의 표준 편차를 나타냄.

도 4는 UVB-유도된 세포 손상에 대한 iPSC-Exo의 보호 효과를 나타낸 그림. HDFs를 20×10^8 particles/mL iPSC-Exo으로 24시간 무혈청 배지에서 처리하고 동시에 UVB (315 nm)로 조사하였다. 혈청 함유 성장 배지에서 기재된 시간 간격 동안 더 배양하고 생존 세포의 군을 MTT 어세이로 결정하였다. UVB-조사 및 iPSC-Exo-미처리 그룹과 비교한 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. 여러 바는 싱글 대표적인 실험에서 3회 반복 샘플의 표준 편차를 나타냄.

도 5는 iPSC-Exo이 UVB-조사된 HDFs에서 특정 피부 마커의 변경된 발현을 회복한다는 것을 나타내는 그림. HDFs를 20×10^8 particles/mL iPSC-Exo으로 24시간 무혈청 배지에서 처리하고, 48시간 후 HDFs를 모았다. collagen

type I (A); MMP-1 (B); 및 MMP-3 (C)의 mRNA 발현 레벨을 정량적 실시간 RT-PCR로 정량하였다. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. 에러 바는 싱글 대표적인 실험에서 3회 반복 샘플의 표준 편차를 나타냄.

도 6은 노화 HDFs에서 SA- β -Gal의 효과를 나타낸 그림. 대조군과 노화 HDFs의 계대 수는 각각 5와 31. (A)SA- β -Gal- 양성 세포는 광학 현미경 하에서 관찰할 때 청색을 나타냄. (B) 세포를 세 부류로 나누었음; 염색안됨, 약함 및 강함, 그리고 각 그룹의 세포수를 퍼센트로 나타냄. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 은 iPSC-Exo-미처리된 노화 그룹과 비교함. 통계 분석은 세 다른 이미지로 수행함.

도 7은 iPSC-Exo이 노화 HDFs에서 특정 피부 마커들의 변화된 발현을 회복한다는 것을 나타낸 그림. collagen type I (A); MMP-1 (B); 및 MMP-3 (C)의 mRNA 발현 레벨을 정량적 실시간 RT-PCR로 정량화하였다. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. 에러 바는 싱글 대표적인 실험에서 3회 반복 샘플의 표준 편차를 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1: 세포 배양

본 발명에서 본 발명자들은 인간 iPSC를 대한민국 국립 줄기세포 재생 센터(National Center for Stem Cell and Regenerative Medicine in Korea)로부터 확보하였다. 이 세포주는 Sendai Virus를 사용하여 Oct4, Sox2, cMyc 및 Klf4를 인간 피부 섬유아세포에 투여하여 제조되었다. 컨푸루언시가 80~90%에 도달할 때, 그 iPSCs를 0.5 mM EDTA로 처리하여 해리하고, 트랜케이드된 인간 vitronectin-코팅된 배양 디쉬 상에 플레이팅하였다. 세포들을 Essential 8 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하고 4에서 5일마다 계대하였다. 또한 인간 HDFs(human dermal fibroblasts)를 10% 우태아 혈청 및 penicillin/streptomycin이 보충된 DMEM에서 배양하였다. 반복적인 노화를 유도하기 위하여, HDFs를 반복되는 계대로 장시간 동안 배양하였다. 컨푸루언시가 70~80%에 도달할 때, HDFs를 새 디쉬로 2×10^4 cells/cm² 로 플레이팅하고 70~80% 컨푸루언트를 다시 얻을 때까지 배양하였다. 모든 세포는 37°C에서 5% CO₂를 포함하는 습도 분위기에서 배양하였다.

실시예 2: 엑소좀 분리

배양 배지를 신선한 Essential 8 배지로 매일 인간 iPSCs 배양에서 교체하였다. 사용된 배지는 2일째부터 배양 종료까지 매일 모았다. 엑소좀은 제조업자의 지시에 따라서 ExoQuick-TCTM (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 조건 배지로부터 분리하였다. 요약하면, 조건 배지를 엑소좀 침전 용액으로 4°C에서 12시간 동안 배양한 후 1,500 xg에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 버린 후 펠렛을 PBS(phosphate buffered saline)에서 재부유하였고 모든 iPSC-Exo를 사용때까지 -80°C에서 저장하였다.

실시예 3: iPSC-Exo의 특성 규명

iPSC-Exo의 크기 분포 및 농도를 NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, U.K.)를 사용한 NTA(nanoparticle tracking analysis)에 의하여 분석하였다. iPSC-Exo를 함유한 용액을 1 mL 주사기를 사용하여 레이저 트래커 챔버로 주사하고 세번의 30 sec 기록을 수행하였다. iPSC-Exo의 모드, 평균 크기 및 농도를 NTA 3.0 software로 결정하였다. 카메라 레벨, 역치 및 초점은 모든 실험에도 동일하게 유지하였다. Morphology of iPSC-Exo의 형태를 JEM-1010 전자 현미경(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용한 투과 전자 현미경법(TEM)으로 확인하였다. 먼저, iPSC-Exo를 formvar/carbon-코팅된 그리드에서 10분간 흡수하고 2% paraformaldehyde로 고정화하였다. 2% uranyl acetate로 10분간 음성 염색 후, iPSC-Exo를 60 kV에서 작동된 TEM으로 관찰하였다. Zeta 포텐셜을 Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, U.K.)을 사용하여 측정하였다.

실시예 4: MTT 어세이

HDFs를 2×10^4 cells/cm² 로 96-웰 배양 플레이트에 플레이팅하고 24시간 동안 성장 배지에서 배양하였다. 혈청 결핍을 위하여, 배지를 0.5% FBS가 보충된 DMEM으로 교환하고 24시간 추가 배양하였다. iPSC-Exo를 무혈청 DMEM/F12에서 24시간 동안 처리한 후, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후, dimethyl sulfoxide를 첨가하여 formazan을 용해한 후 560 nm에서 흡광도를 마이크로플레이트 리더로 측정하였다.

실시예 5: 이동 어세이

iPSC-Exo의 HDFs의 이동에 대한 효과는 스크래치 운드(scratch wound) 및 트랜스웰 이동 어세이로 측정하였다.

스크래치 윈드 어세이에서, 요약하면, 스크래치를 멸균된 피펫 팁을 사용하여 혈청 결핍 HDFs의 70~80% 컨플루언트 모노레이어를 스코어링하여 생성하였다. 20×10^8 particles/mL iPSC-Exo으로 무혈청 DMEM/F12을 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 스크래치된 면적으로 HDFs의 이동을 광학 현미경 하에서 모니터링하였다. 트랜스웰 이동 어세이를 위하여, HDFs를 혈청 포함 성장 배지를 포함하는 트랜스웰 플레이트(Corning, Lowell, MA, USA)의 상단 챔버에 플레이팅하고 24시간 동안 배양하였다. iPSC-Exo을 포함하는 무혈청 DMEM/F12로 배지를 교환한 후, 세포를 24시간 동안 추가 배양하여 트랜스웰 막의 반대편으로 이동을 유도하였다. 면봉으로 막의 탑에 남아 있는 세포를 제거한 후, 막의 하부의 세포들을 4% paraformaldehyde로 고정한 후 0.5% crystal violet (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 염색하여 이동된 세포들을 확인하였다. 염색 강도를 그 crystal violet를 50% 초산으로 녹인 후 560nm에서 흡광도로 측정하였다.

[0064] 실시예 6: UVB 조사

HDFs를 어세이에 따라 96- 또는 24-웰 플레이트에 플레이팅하고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 세포를 20×10^8 particles/mL iPSC-Exo으로 무혈청 DMEM/F12에서 24시간 동안 처리하였다. 3회 세척한 후, 50 ul 및 200 ul의 PBS를 96- 및 24-웰 플레이트에 각각 첨가하였다. 세포를 Bio-Sun illuminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)에 의하여 생성된 UVB (315 nm)로 조사하였다. 광 강도를 UV illuminator 및 각 웰 플레이트 사이의 거리에 따라서 측정하였다. UV 조사한 후, PBS를 DMEM/F12으로 교환한 후 그 세포를 특정 어세이 전에 24 h 또는 48 h 동안 추가 배양하였다.

[0066] 실시예 7: SA-β-Gal 염색

노화 HDFs를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 20×10^8 particles/mL iPSC-Exo 처리 후, 그세포를 무혈청 DMEM/F12에서 48시간 더 배양하였다. 그 다음 그 세포를 The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde로 고정하고 SA-β-Gal를 노화 세포 조직화학 염색 키트(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 염색하였다. 각 웰당 세 이미지를 모아서 SA-β-Gal 염색된 세포를 계수하였다.

[0068] 실시예 8: RNA 분리 및 실시간 RT-PCR

전체 RNA를 HDFs로부터 GeneAll Ribospin™ total RNA 정제 키트(GeneAll Biotechnology Co. Ltd., Seoul, South Korea)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라서 추출하였다. 정제된 전체 RNA를 TOPscript™ RT DryMIX (Enzynomics Co. Ltd., Daejeon, South Korea)를 사용하여 dT 18 plus 프라이머로 cDNA로 역전사하였다. 그 후, PCR 스텝을 cDNA 샘플로부터 특정 프라이머 및 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with high ROX, Enzynomics Co. Ltd. Daejeon, South Korea)를 사용하여 Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA) 상에서 3중으로 수행하였다. 본 발명에 사용된 프라이머는 표 2에 요약하였다. 표준 사이클 조건은 하기와 같다: 95℃ 에서 1분, 40 사이클의 변성 95℃에서 15 sec 및 어닐링-익스텐전 60℃에서 30 sec. 특정 RNAs의 발현 수준은 내부 대조군으로 액틴으로 표준화하였다.

표 2

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
β-actin	Sense	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAC
	Antisense	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TT
MMP-1	Sense	CAT CGT GTT GCA GCT CAT GA
	Antisense	ATG GGC TGG ACA GGA TTT TG
MMP-3	Sense	TGC TGC TCA TGA AAT TGG CC
	Antisense	TCA TCT TGA GAC AGG CGG AA
Collagen type I	Sense	CTC GAG GTG GAC ACC ACC CT
	Antisense	CAG CTG GAT GGC CAC ATC GG

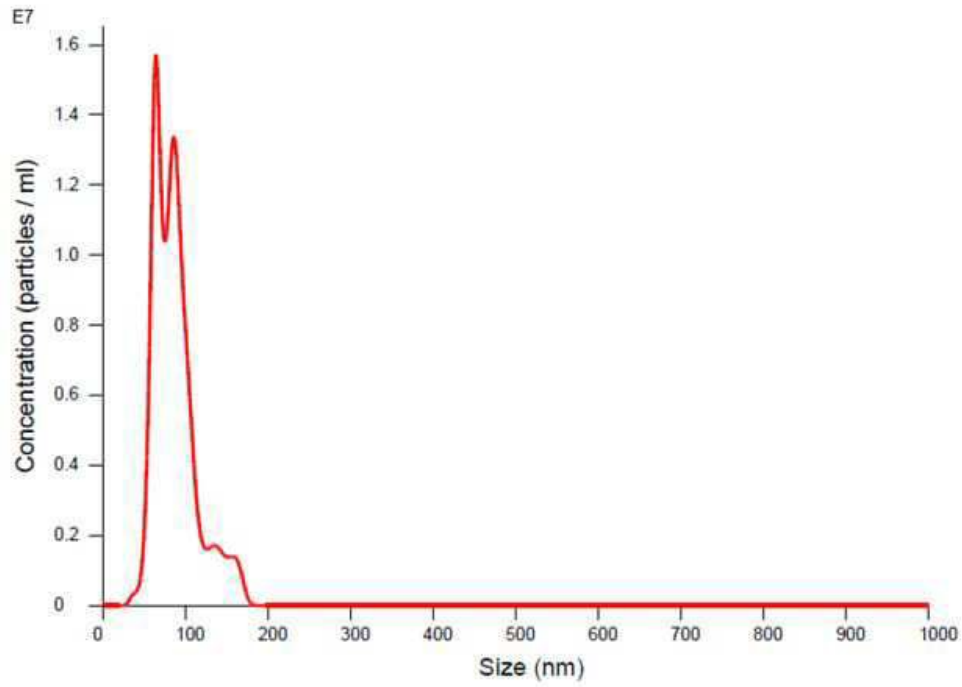
표 2는 real-time RT-PCR을 위한 프라이머 리스트

본 발명의 결과들은 평균±표준편차로 표시하고 Student's *t*-test로 통계적으로 분석하였다. 통계적 유의성을 *p* < 0.05에서 표시하였다.

도면

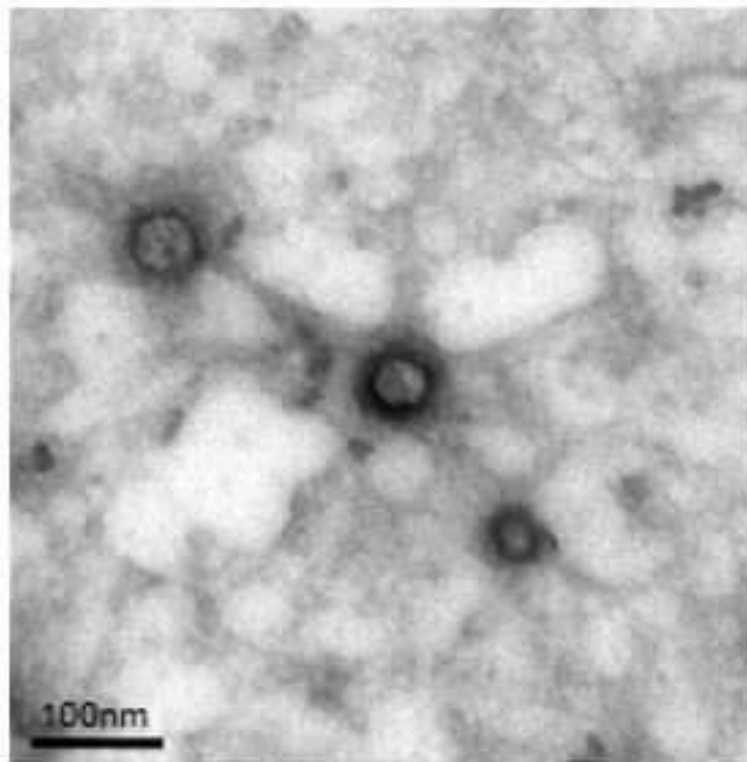
도면1a

A



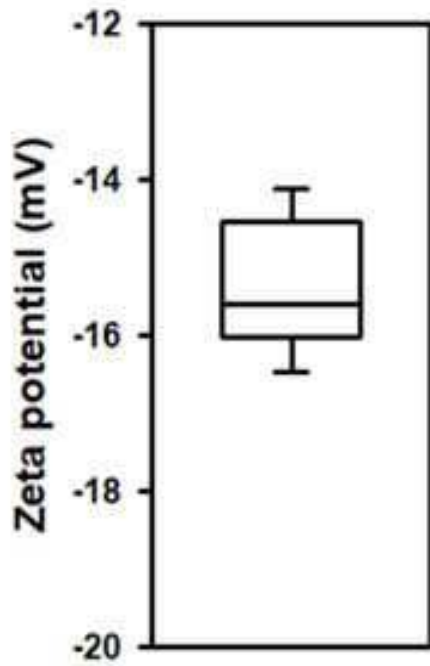
도면1b

B

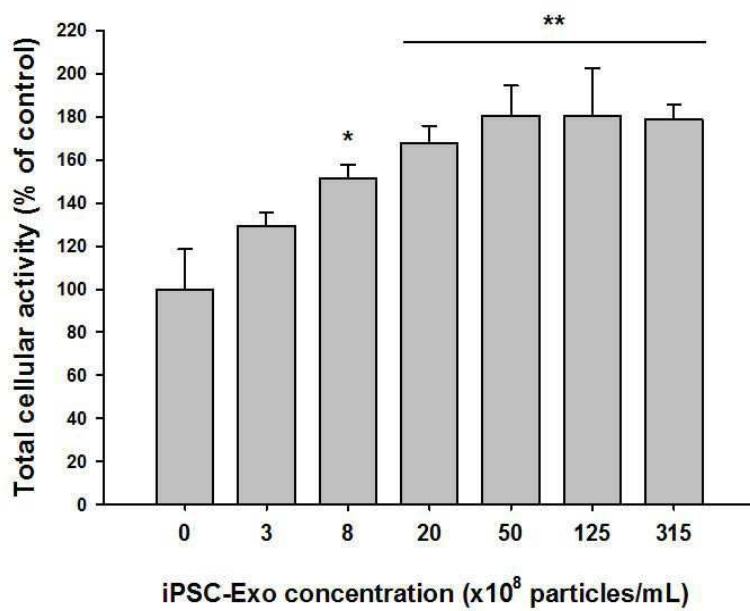


도면1c

C



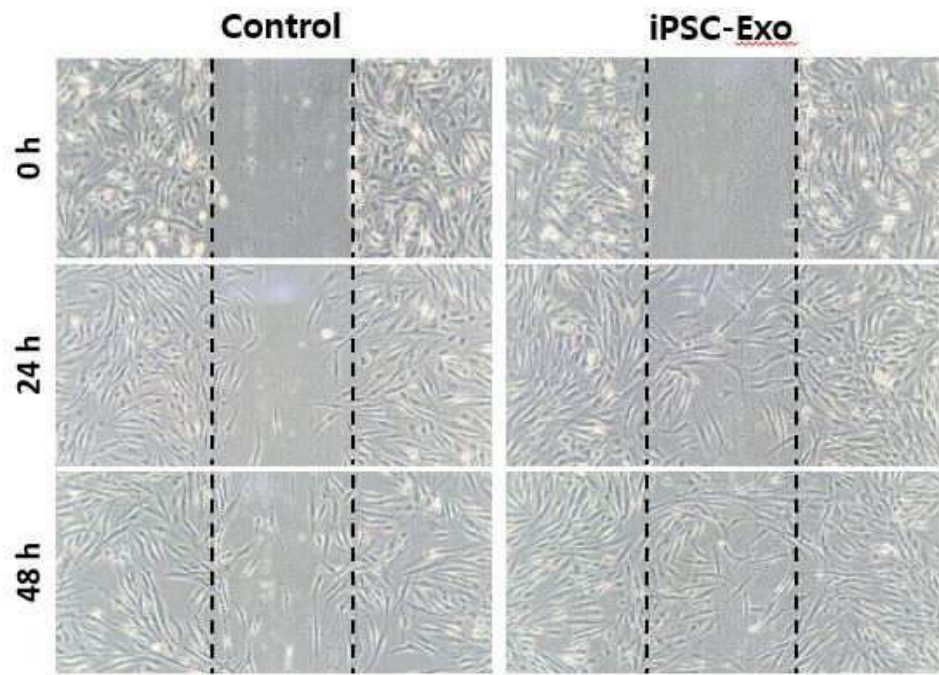
도면2



(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

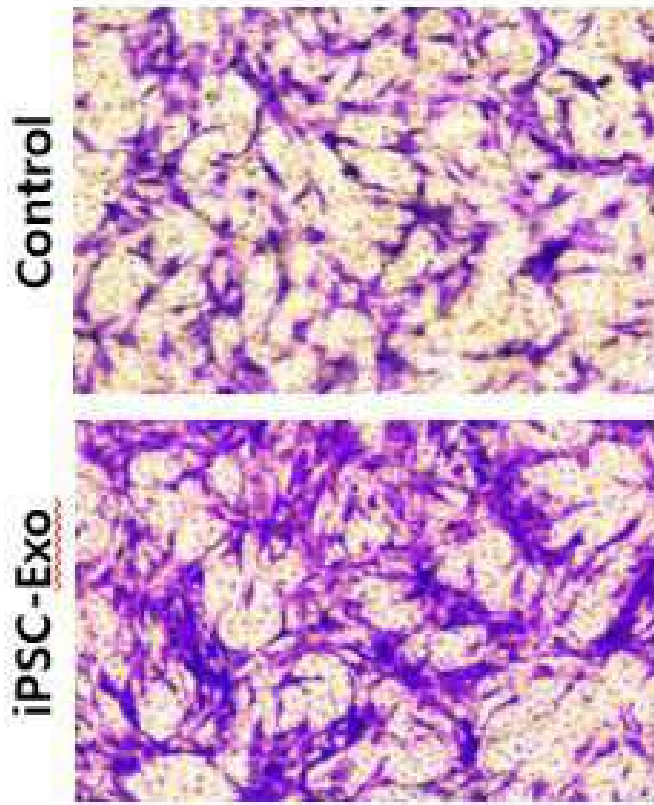
도면3a

A



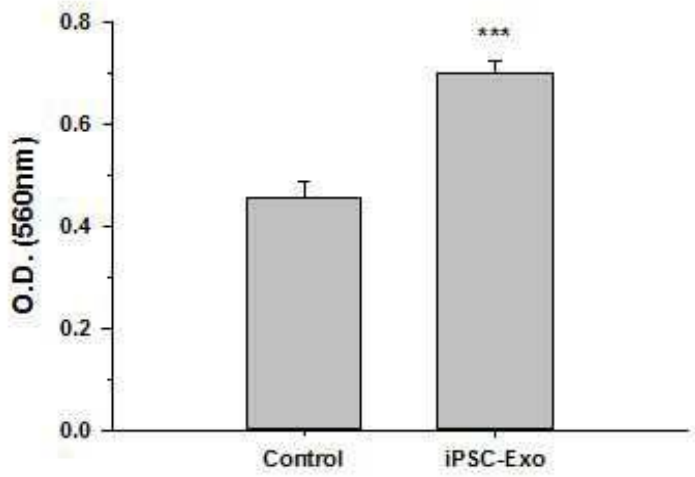
도면3b

B

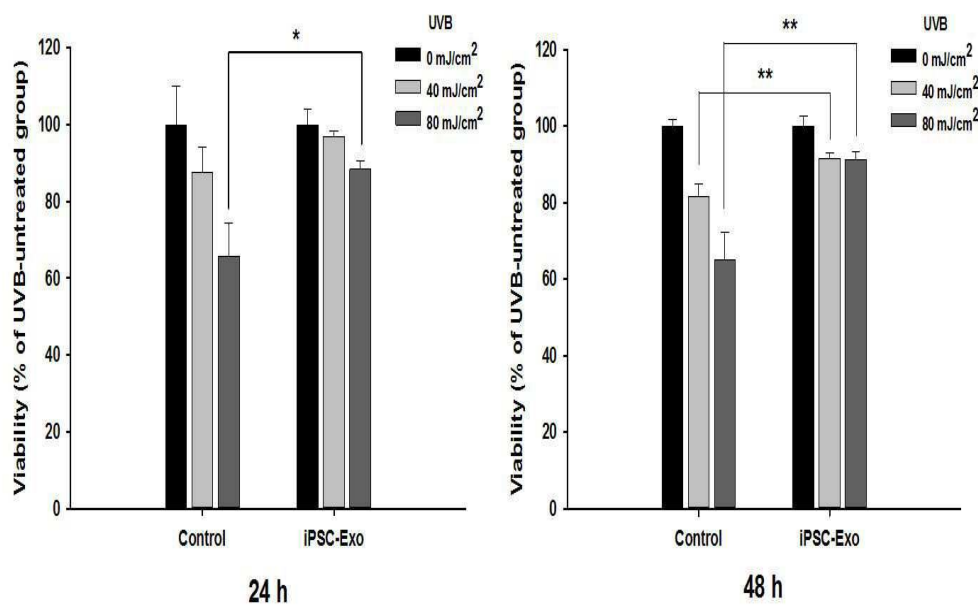


도면3c

C

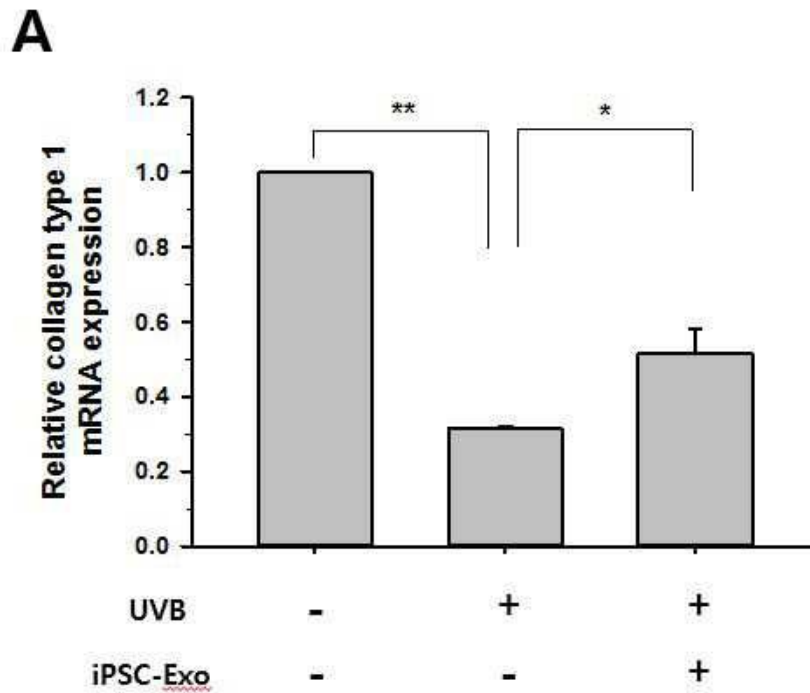


도면4

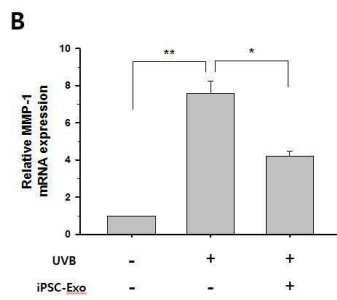


(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

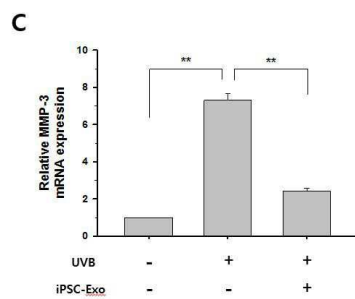
도면5a



도면5b

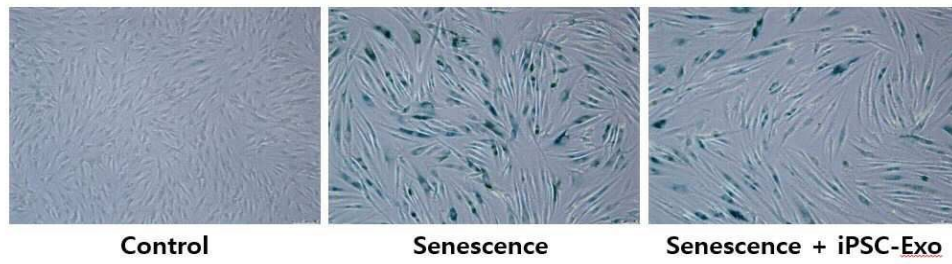


도면5c



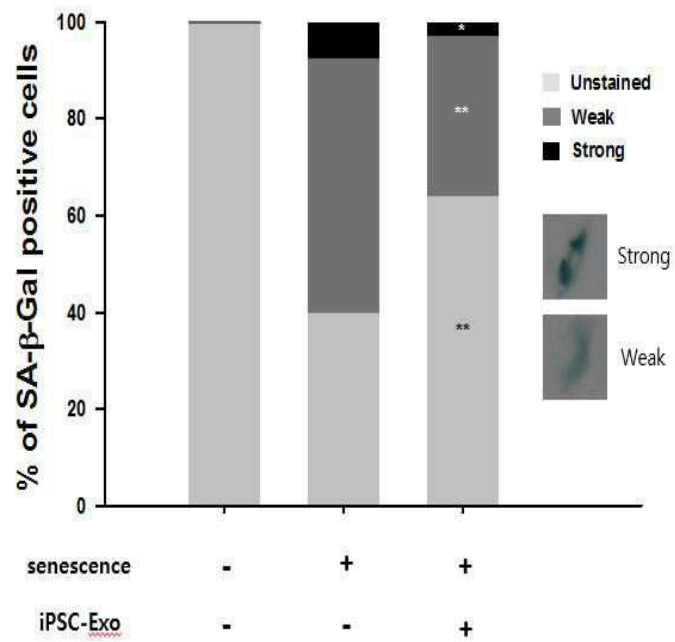
도면6a

A

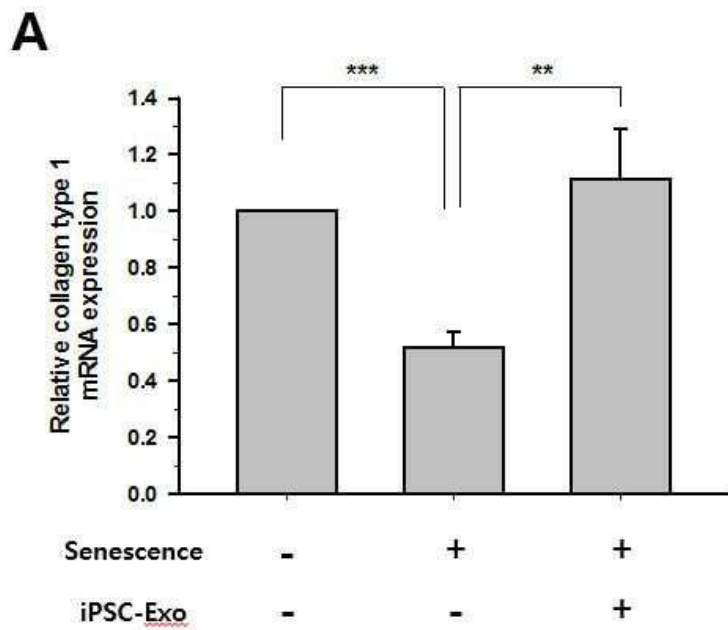


도면6b

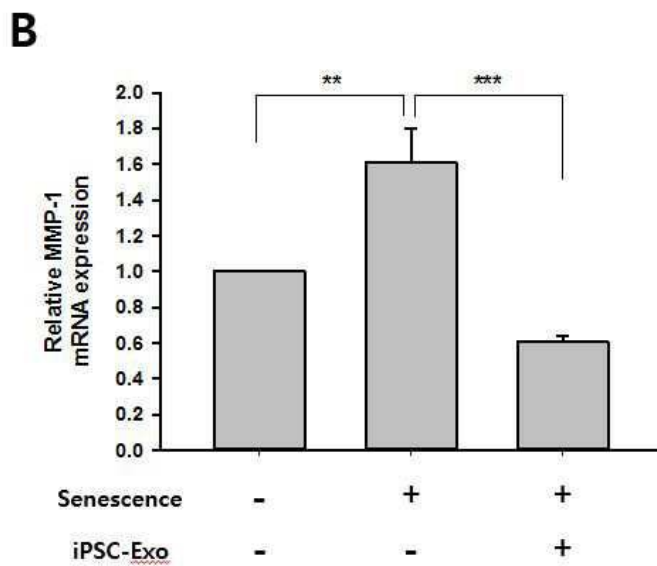
B



도면7a



도면7b



도면7c

C

