



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0109076
(43) 공개일자 2022년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/073 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0603 (2013.01)

C12N 2500/80 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0012330

(22) 출원일자 2021년01월28일

심사청구일자 2021년06월30일

기술이전 회망 : 기술양도

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

공일근

경상남도 진주시 진주대로 1317, 11동 1802호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)

(74) 대리인

위병갑

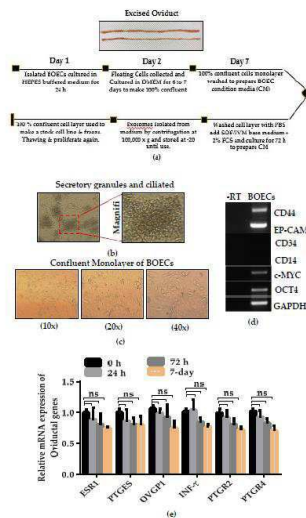
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 소 난관상피세포 유래 엑소좀의 신진대사 흐름의 회복에 의한 미토콘드리아의 건강 회복과 배발달을 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 수정란 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 소 난관상피세포 유래 엑소좀의 신진대사 흐름의 회복에 의한 미토콘드리아의 건강 회복과 배발달을 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 수정란 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 체외 수정란을 배양시 소 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosomes)의 첨가는 수정란의 대사효율을 개선시킴으로써 수정란의 발달효율을 향상시킬 수 있기 때문에, 궁극적으로 OPU 유래 수정란 생산을 위한 배양액을 개선할 수 있어 우수한 품질과 높은 효율로 소 배아를 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021988
과제번호	120066011SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농축산물안전유통소비기술개발(R&D)
연구과제명	우량 한우 암컷 수정란 생산기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	농업회사법인 (주)더킹콩
연구기간	2020.04.29 ~ 2021.04.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425146765
과제번호	S2971179
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	2020년도 창업성장기술개발사업 '디딤돌 창업과제(첫걸음)'
연구과제명	효과적인 동결수정란이식위한 관련 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	농업회사법인 (주)더킹콩
연구기간	2020.12.31 ~ 2021.12.30

명세서

청구범위

청구항 1

소 난관상피세포(Bovine oviduct epithelial cell) 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀(Exosome)을 포함하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 소 난관상피세포는 세포가 합쳐진 단일층을 형성하여 배양되는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 엑소좀은 배지 조성물 내에 0.01 내지 10 % 부피비율로 포함하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배아 발달 촉진은 소 난모세포의 수정 이후에서 배반포까지의 배아 발달을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 소 난관상피세포(BOEC) 배양물 및 엑소좀(Exosome)은 피루베이트 흐름을 재구축하여 체외에서 생산되는 배아의 TCA 사이클 대사를 개선하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은, 엑소좀을 단독 보충되는 경우, 배아의 CPT1 유전자의 발현을 증가시키고, PDK4 유전자의 발현을 억제하여 피루베이트(pyruvate)의 TCA 사이클로의 유입을 개선하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충되는 경우, 배아의 피루베이트 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase, PDH) 및 글루타메이트 탈수소 효소 1 (glutamate dehydrogenase 1, GLUD1) 발현을 향상시키고, Sirt4 유전자의 발현을 감소시켜, TCA 사이클로의 피루베이트(pyruvate) 유입을 개

선하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 0.01 내지 3 % 부피비율의 우아 혈청(fetal calf serum)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 배아 체외 생산용인 것을 특징으로 하는, 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중에 어느 한 항의 배지 조성물에 소 수정란을 배양하는 단계;를 포함하는, 소 배아 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소 난관상피세포 유래 엑소좀의 신진대사 흐름의 회복에 의한 미토콘드리아의 건강 회복과 배발달을 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 수정란 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 난관 유체 미세 환경은 성장 자극 인자, 면역 조절 성분 및 세포 외 소포체/엑소좀(Exosome, Exo)으로 구성되며, 이들 모두는 일련의 주요 생식 이벤트 동안 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 난관상피(oviduct epithelium)는 배아 발달에서 성공적인 성체로의 전체 여정에 영향을 미치는 난관 유체를 만드는 여러 섬모 및 분비 세포의 집단을 가지고 있다. 소 난관상피세포(bovine oviduct-epithelial cells, BOECs)와 배아 및 추출된 분비물(secretome)을 체외 시스템에서 공동 배양하여 수정에 도움이 되는 환경을 만들고 초기 배아 단계를 제공한다. 난관상피세포와 그 유도체의 공동 배양 시스템을 사용하여 체외에서 생산된 포유류 배아의 발달 중단을 극복하여 궁극적으로 임신률과 배아 이식 결과를 향상시킨다. 정상적인 대사 기능의 상실은 체외 생산(in vitro produced, IVP) 포유류 배아시기의 발달 중단의 원인 중 하나이다. 체외 배지에서 모체 신호가 없으면 배아가 확장 및 증식에 필요한 ATP의 증가하는 수요를 극복하기 위해 외부 환경에서 사용 가능한 영양분을 흡수할 수 없게 된다. 따라서 난관 분비물이 포유류 배아 발달에 미치는 영향에 관한 연구는 보조생식기술(assisted reproductive technologies, ART) 절차의 개선뿐만 아니라 체외 생산의 개선을 지속적으로 수행되어야 한다.

[0004] 난관상피세포 배양 시스템 및 그 파생물의 광범위한 응용은 보조 생식 기술(ART)의 발전을 향한 중요한 단계로 간주된다.

[0005] 기존의 시험관 내 미세 환경은 생체 내 난관 유체 구성을 거의 모사하도록 공식화되었지만, 현재 사용 가능한 배지에는 여전히 다양한 알려지지 않은 난관 유체 단백질 및 엑소좀(Exo)이 부족하다. 엑소좀은 상피 세포의 분비로 생성되는 난관 액에 존재하는 매우 중요한 생리 활성 분자이다. 이러한 나노 크기의 서들은 배아 막을 가로 질러 이식전 배아 발달을 조절하고 배아-모성 상호 작용 사이의 누화를 조절하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

- [0006] 엑소좀은 단백질, 지질, RNA 종류(mRNA, miRNA, 긴 비코딩 RNA) 및 DNA 단편과 함께 로드되어 인지질 이중층 막에 의해 캡슐화된다. 이러한 조절 생리 활성 분자는 엑소좀이 세포의 환경을 통해 인접한 세포와 먼 세포 사이의 생리적 및 병리생리학적 기능과 관련된 여러 신호 전달 경로의 반응을 매개 할 수 있게한다. 세포 외 환경에서 배아에 의한 엑소좀의 흡수는 외인성 생체 분자 전달 도구를 통해 난관 상피와 발달중인 배아 사이의 세포내 상호작용에 대한 새로운 통찰력을 제공한다.
- [0007] 발달중인 배아는 난관을 통과하는 여정 동안 몇 가지 중요한 형태학적 및 전사적 변화를 겪는다. 여러 연구에서 난관상피세포(BOEC)와 그 분비물(secretome)을 사용하여 초기 배아 발달에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 발달 능력, 저온 내성, 배아 계능 활성화 시기, 후성 유전적 변형 획득 및 세포 증식 측면에서 관찰될 수 있다. 포유류 배아, 특히 반추 동물의 체외 배양 동안 8-16 세포 압축 상실기에서 발달이 정지된 반면, 난관상피세포 또는 이로부터 분리된 조건배지의 공동 배양 시스템을 사용하면 발달 차단 및 IVP 배아의 생존 가능성을 증가하여 이를 극복 할 수 있음이 입증되었다. 이러한 증거는 난관상피세포의 분비 인자가 발달중인 배아와 외부 환경 사이의 신호 전달을 통해 배양 배지의 영양분과 대사산물을 변화시키는 놀라운 효과가 있음을 보여준다. 그러나 여러 강력한 증거가 난관상피세포 유래 조건 배지(CM) 및 난관상피세포에서 분리한 엑소좀이 IVP 배아의 정 성적 수율에 미치는 유리한 효과를 보여주었으나, 그러나 난관-배아 상호작용과 관련된 분자 메커니즘적인 배아의 발달 반응은 아직 알려지지 않았다.
- [0008] 발달중인 배아의 대사 반응을 고려할 때, 생쥐 배아의 시험관 내 발달에 대한 연구는 초기 착상 단계에서 피루베이트 흡수에 대한 선호를 보여 주었지만, 포도당도 상실배에서 배반포로의 변화 중에 필수적이다. 압축 후에 포도당 섭취가 증가하는 반면, 피루베이트 섭취의 요구는 상실 단계 이후의 발달을 지원하기 위해 높게 유지되었다. 인간 체외 배아 발달에 대한 연구는 또한 배반포 단계까지 발달하는 동안 피루베이트의 필요성을 시사하였다. 이들은 성장 배지가 착상전 발달 과정에서 에너지 대사에 중요한 영향을 미치며, 이는 미토콘드리아 건강과 체외에서 생산된 배아의 발달 능력을 향상시킨다. 피루베이트(Pyruvate)는 ATP 생성을 위한 미토콘드리아 TCA(tricarboxylic acid) 회로의 필수 분자이다. 피루베이트가 TCA 회로에 들어가는 것을 차단하면 대사 흐름을 방해하고 미토콘드리아의 기능 장애를 유발한다. 체외에서 압축 단계에서 발달이 정지되는 것은 TCA 회로에 대하여 피루베이트가 불충분한 결과일 수 있다.
- [0009] 난관 유체의 생체 내 미세 환경은 몇 가지 중요한 생물학적 분자를 제공한다 : 지질, 단백질 및 필수 아미노산은 배아 발달 전반에 걸쳐 정상적인 대사 흐름을 지원한다. 그러나, 난관 분비 및 배아와 난관 사이의 세포간 통신에 대한 현재의 증거는 여전히 결정적인 연구가 필요하다. 현재 연구는 소 난관상피세포-monolayer 유래 조건배지 및 엑소좀의 사용에 초점을 맞추고 있으며, 체외 배아 발달 동안 대사 흐름을 개선하는 역할에 특히 중점을 두고 있다.
- [0010] 이와 같이 소 체외수정란의 생산은 한우개량을 위해 반드시 필요함 기술이다. 실제 OPU(Ovum pick-up) 유래 수정란의 생산 및 이식을 위해서 체내수정란과 가장 유사한 배양액에서 배양한 수정란이 배 발달율과 질적 수준이 높아진다. 그러나 다양한 배양액의 개발이 이루어져 왔으며, 혈청을 첨가한 배지, 무혈청 배지 등이 개발되었다. 무혈청 배지의 장점이 많아 실용화되고 있었으나 배 발달율, 수정란의 질적수준 및 동결수정란의 생산 등에서 보다 더 체내수정란과 유사한 수준의 수정란을 생산이 필요하다.
- [0011] 따라서, 본 발명자들은 시험관 내 배양 배지에 소 난관상피세포-조건 배지(BOECs-CM) 및 소난관상피세포-엑소좀(BOECs-Exo)을 첨가하면, 업스트림 억제제를 차단하고 피루 베이트 탈수소 효소 (PDH) 및 글루타메이트 탈수소 효소 1 (GLUD1) 발현을 상향 조절하여 피루베이트 흐름을 회복한다는 것 확인하였다.
- [0012] 또한, 소 난관상피세포-조건 배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)의 존재 하에서 배양된 IVP 배아의 분자 메커니즘에 대한 설명을 제공했으며, 이는 궁극적으로 미토콘드리아 기능을 향상시키는 피루베이트 흐름을 재설정함으로써 배아의 대사 반응에 큰 영향을 준다. 본 발명에서 압축된 상실 단계의 발달 차단을 제거하는 소 난관상피세포-단층(monolayer) 유래 조건배지 및 엑소좀을 사용하여 에너지 대사와 상실배 발달 저지 사이의 중요한 연관성을 확립하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0715188호

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Oviductal secretion and gamete interaction. Reproduction 2015, 149, (1), R1-R14.

(비특허문헌 0002) Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. Reproduction 2017, 154, (3), 153-168.

(비특허문헌 0003) Blastocyst metabolism. Reprod Fertil Dev 2015, 27, (4), 638-54.

(비특허문헌 0004) An oviduct-on-a-chip provides an enhanced in vitro environment for zygote genome reprogramming. Nat Commun 2018, 9, (1), 4934.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은, 소 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosomes)을 포함하는 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명의 다른 목적은 소 배아 배양 방법으로서, 소 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosomes)을 포함하는 배지 조성물에 소 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 소 배아 배양 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 이상에서의 본 발명에서 해결하고자 하는 다양한 과제들은 이에 한정하는 것이 아니라, 후술할 실시예 및 청구 범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 진술한 목적을 달성하기 위해 본 발명에 따른 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물은 소 난관상피세포(Bovine oviduct epithelial cell) 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀(Exosome)을 포함한다.

[0022] 여기서, 상기 소 난관상피세포는 세포가 합쳐진 단일층을 형성하여 배양되는 것일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 엑소좀은 배지 조성물 내에 0.01 내지 10 % 부피비율로 포함할 수 있다.

[0024] 여기서, 상기 배아 발달 촉진용 소 난관세포의 수정 이후에서 배반포까지의 배아 발달을 촉진하는 것일 수 있다.

[0025] 또한, 상기 소 난관상피세포(BOEC) 배양물 및 엑소좀(Exosome)은 피루베이트 흐름을 재구축하여 체외에서 생산되는 배아의 TCA 사이클 대사를 개선하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 또한, 상기 배지 조성물은, 엑소좀을 단독 보충되는 경우, 배아의 CPT1 유전자의 발현을 증가시키고, PDK4 유전자의 발현을 억제하여 피루베이트(pyruvate)의 TCA 사이클로의 유입을 개선하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 또한, 상기 배지 조성물은, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충되는 경우, 배아의 피루베이트 탈수소효소 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 및 글루타메이트 탈수소 효소 1 (glutamate dehydrogenase 1, GLUD1) 발현을 향상시키고, Sirt4 유전자의 발현을 감소시켜, TCA 사이클로의 피루베이트(pyruvate) 유입을 개선하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 또한, 상기 배지 조성물은 0.01 내지 3 % 부피비율의 우아 혈청(fetal calf serum)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 여기서, 상기 배지 조성물은 배아 체외 생산용일 수 있다.

[0030] 한편, 본 발명의 다른 실시예에 따르면 상기 배지 조성물에 소 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 소 배아 배양 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 전술한 바와 같은 본 발명에 따르면, 체외 수정란을 배양시 엑소좀의 첨가는 수정란의 대사효율을 개선시킴으로써 수정란의 발달효율을 향상시킬 수 있기 때문에, 궁극적으로 OPU 유래 수정란 생산을 위한 배양액을 개선할 수 있어 우수한 품질과 높은 효율로 소 배아를 생산할 수 있다.

[0034] 이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 발명의 소 난관상피세포 (BOEC)의 형태 및 특성을 나타낸 것이다. (a) BOEC 격리 및 배양의 개략도, (b) 24 시간 배양 후 응집된 섬모 세포, 세포 표면에 섬모와 같은 구조의 모습. (c) 배양 며칠 후 전형적인 상피 형태를 보여주는 분리된 BOECs- 단층. (d) RT-PCR은 특징 상피 및 세포 증식 마커의 존재와 세포 배양에서 조절 (CD34 및 CD14) 마커의 부재를 표시 (e) 세포 파종 0, 24, 72 시간 및 7 일에 배양 된 BOEC 단층에서 여러 난관 마커 유전자의 발현 프로파일에 대한 qRT-PCR 분석 결과.

도 2는 본 발명의 소 난관상피세포(BOEC) 유래 엑소좀(Exo)의 특성 및 정량 측정결과를 나타낸 것이다. (a) 100x 희석 샘플을 사용하여 나노 입자 추적 분석 (NTA)에 의해 측정 된 BOEC 유래 엑소좀의 크기 분포. (b) 100-200 nm 비드의 NTA 스크린 샷. (c-d) BOEC 유래 엑소 단백질 농도의 정량화를 나타내는 ELISA 그래프. Standard-Exo는 Exo-ELISA 데이터에서 CD9를 운반하는 Exo의 정량화를 위한 보정 곡선을 생성하는 데 사용되었다.

도 3은 본 발명의 소 난관상피세포(BOEC) 단일층 유래 조건 배지 및 엑소좀 보충이 소 배반포 생산 수율 및 품질에 미치는 영향을 나타낸 것이다. (a-b) 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM)의 부재 또는 존재 및 다양한 엑소좀 농도에서 배양된 배반포의 발달 및 부화율%를 보여주는 막대 그래프. (c) 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀 보충에 대한 여러 배반포의 이식 잠재력 및 발달 능력 관련 유전자의 발현 프로파일에 대한 qRT-PCR 분석결과. (d-e) 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀의 부재 또는 존재하에 배양된 8 일째 배반포에서의 면역 형광 분석 정량화 막대 그래프.

도 4는 본 발명의 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 보충이 소 배반포 발달 동안 ROS 수준 및 세포사멸에 미치는 영향을 나타낸 것이다. (a) 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀의 존재하에 배양된 8 일째 배반포에서 ROS의 축적을 보여주는 DCHDA 염색. (b) 형광 강도의 정량화를 나타낸 막대 그래프. (c) 대조군, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀 배양 그룹에서 MnSOD1, GLUT1 및 G6PD의 상대적 mRNA 수준. (d) 대조군, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀 보충 그룹에서 TUNEL 양성 세포 (빨간색) 및 DAPI (파란색)를 보여주는 형광 이미지. 핵의 세포 사멸 세포는 흰색 화살표로 표시. (e-f) 막대 그래프 데이터는 배반포 당 평균 TUNEL (+) 핵과 표시된 그룹의 총 세포 수. (g) 표시된 그룹에서 대표적인 세포 사멸 유전자의 발현을 보여주는 qRT-PCR 분석.

도 5는 본 발명의 소 배아 체외 배양 중 FAO 및 TCA 사이클 대사의 이용에 대한 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 보충의 효과를 나타낸 것이다. (a) 형광 나일 프로브 (빨간색) 염색은 대조군, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 보충 그룹에서 8 일째 배반포에서 지질 함량의 축적. (b) 각 그룹에서 평균 $\pm$ SEM으로 제시된 형광 강도의 정량화 ($n = 20$). (c-d) 표시된 조건에서 배양된 8 일째 배반포에서 지질 및 TCA 사이클 대사 유전자의 상대적 mRNA 발현을 제시하는 qRT-PCR 분석 막대그래프 (e) 가설 모델의 지질 및 포도당 대사를 이용하여 배아 발달에 대한 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 보충 효과의 작용 메커니즘.

도 6은 본 발명의 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀의 보충에 대한 소 배아 발달 동안의 미토콘드리아 기능변화를 나타낸 것이다. (a) JC-1 염색의 형광 공 초점 현미경 이미지, 대조군, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 그룹에서 J- 모노머 (녹색) 및 J- 응집체 (빨간색)의 존재에 의해 감지 된 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$. 파란색으로 염색 된 핵. 원래 배율 100 배. (b) 상대 형광 강도에 대한 정량화가 그래프. (c) 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 3 % 엑소좀의 부재 또는 존재하에 배양 된 8 일째 배반포에서 분석된 미토콘드리아 OXPHOS 서브 유닛 및 ATP 합성 유전자의 상대적 mRNA 발현 프로파일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.
- [0038] 본 발명은 소 난관상피세포 유래 엑소좀이 신진대사 흐름의 회복에 의한 미토콘드리아의 건강 회복과 배발달을 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배아 배양 방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명은 소 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosomes)을 포함하는 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물을 제공한다.
- [0040] 구체적으로 본 발명은 소 난관상피세포(Bovine oviduct epithelial cell) 배양물 또는 이로부터 분리된 엑소좀(Exosome)을 포함하는 소 배아 발달 촉진용 배지 조성물일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 소 난관상피세포는 세포가 합쳐진 단일층을 형성하여 배양된 배양물을 조건 배지(Condition media)로 이용될 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 소 배아 배양 방법으로서, 상기 배지 조성물에 소 수정란을 배양하는 단계를 포함하는 소 배아 배양 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명자들은 소 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosomes)의 배양액 첨가가 수정란의 배발달 동안 신진대사 흐름을 회복시켜 미토콘드리아 건강을 개선함으로써 수정란의 발달율의 향상과 질적 개선을 가질 수 있음을 확인하였다. 구체적으로 본 발명은 소 수정란을 체외 배양할 때에 엑소좀(Exosomes) 첨가 시 TCA-cycle로 피루베이트(pyruvate) 유입을 회복시켜 수정란의 대사를 조절에 강력한 영향을 미치는 것으로 나타났다.
- [0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "체외 배아 생산"은 도축장에서 채취한 난소에서 미성숙난자를 회수한 후, 인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하고 성숙이 완료된 난자를 동결-융해한 정액으로 체외수정을 실시하여 얻어진 수정란을 배양하여 배아를 생산하는 것을 말한다. 또한, 수정이 이루어진 집합자(zygote)는 인큐베이터(incubator)에서 추가로 7일에서 10일간 체외 배양을 하여 이식이 가능한 상태의 배반포(blastocyst) 단계인 이식가능수정란으로 만든다. 이러한 체외성숙, 수정 및 배양의 연속된 과정을 모두 체외 배아 생산 방법으로 이해될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 체외 수정란을 배양시 엑소좀의 첨가는 수정란의 대사효율을 개선시킴으로써 수정란의 발달효율을 향상시킬 수 있기 때문에, 궁극적으로 OPU 유래 수정란 생산을 위한 배양액을 개선할 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "배반포"는 수정란이 난황을 거둬들이 자라는 과정에서 치밀화된 상실배 이후에 배반포강을 형성하여 태아로 분화할 내세포괴(inner cell mass)와 태반으로 분화할 영양막세포(trophectoderm)로 구분이 될 정도로 발육된 상태의 수정란을 말한다.
- [0047] 본 명세서에서 사용된 용어 "체외배양"이란 수정란이 체내에서 자라는 상태와 구분되는 방법으로 실험실의 인큐베이터(incubator)에 온도 38-39℃, 5% CO₂, 5-10% O₂ 상태로 체내 자궁의 환경과 유사한 조건으로 배양하는 일련의 과정을 말한다.
- [0048] 본 발명에서 조건 배지에 사용되는 소 난관상피세포는 세포가 합쳐져 치밀화된 단일층을 형성하여 배양된 배양물을 이용할 수 있다.
- [0049] 또한, 엑소좀은 배지 조성물 내에 0.01 내지 10 % 부피비율로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 5%의 부피비율로 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 배반포의 발달 및 부화율을 손상을 방지하기 위하여 1 내지 3% 부피 비율을 이용할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따르면 배아 초기의 발달을 촉진하는 것으로, 소 난모세포의 수정 이후에서 배반포까지의 배아 발달을 촉진할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따르면 상기 소 난관상피세포(BOEC) 배양물 및 엑소좀(Exosome)은 피루베이트 흐름을 재구축하여 체

외에서 생산되는 배아의 TCA 사이클 대사를 개선할 수 있다.

- [0052] 또한, 엑소좀을 단독 보충되는 경우, 배아의 CPT1 유전자의 발현을 증가시키고, PDK4 유전자의 발현을 억제하여 피루베이트(pyruvate)의 TCA 사이클로의 유입을 개선할 수 있다.
- [0053] 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충되는 경우, 배아의 피루베이트 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase, PDH) 및 글루타메이트 탈수소 효소 1 (glutamate dehydrogenase 1, GLUD1) 발현을 향상시키고, Sirt4 유전자의 발현을 감소시켜, TCA 사이클로의 피루베이트(pyruvate) 유입을 개선할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 배지 조성물은 0.01 내지 3 % 부피비율의 우아 혈청(fetal calf serum)을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 우아 혈청의 배아 발달 차단을 방지하기 위하여 2% 우아 혈청이 함유하는 것이 좋다.
- [0055] 본 발명에서 체내 수정란과 유사한 수준의 수정란을 생산하기 위해서는 난관상피세포 유래 엑소좀(exosomes)의 첨가로 매우 개선된 결과를 확보할 수 있었다. 특히 엑소좀(exosomes)의 수정란 배양액에 첨가는 해당작용, 즉 TCA-cycle에서 반드시 요구되는 피루베이트(pyruvate)의 유입을 억제하는 PDH, GLUD1의 상위억제제인 PDK4, SIRT4 등을 억제하는 기능을 난관유래 엑소좀(exosomes)의 첨가로 이룰 수 있었다. 그리하여 난관상피세포 유래 엑소좀(Exosome)의 분비가 수정란의 활용할 수 있는 영양분의 이용에 의해 TCA-cycle의 회복과 수정란의 체외발달을 지원하기 위해 피루베이트(pyruvate)의 중요성을 확인할 수 있다.
- [0056] 부가적으로 TCA 사이클로의 기능 개선은 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)의 첨가로 체외 배아 배양에서 미토콘드리아의 더 높은 대사 활성을 동반하였다.
- [0057] 본 발명에서는 처음으로 난관상피세포(BOECs) 유래 엑소좀(Exosome)의 분비가 수정란의 활용할 수 있는 영양분의 이용에 의해 TCA-cycle의 회복과 수정란의 체외발달에 도움을 줄 수 있다.
- [0059] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.
- [0061] <실시예 1> 재료 및 방법
- [0062] 분석에 사용된 모든 화학 물질 / 시약은 달리 명시되지 않는 한 Sigma Aldrich에서 구입하였다.
- [0064] 1.1. 소 난관 상피 세포 (Bovine oviduct epithelial cells, BOEC)의 분리 및 배양
- [0065] 소의 난관은 경상 대학교 동물 보호 이용위원회의 법령에 따라 지역 도축장에서 수집되었다. 도축장에서 제거된 난관은 얼음처럼 차가운 DPBS (Dulbecos phosphate buffered saline)에서 담겨서 2 시간 이내에 실험실로 이송되었다. 난관을 100U / mL 페니실린과 100 µg / mL 스트렙토마이신이 보충된 차가운 DPBS에서 세 번 세척되고 주변 조직없이 절개되었다. 소 난관상피세포(BOECs)는 An oviduct-on-a-chip provides an enhanced in vitro environment for zygote genome reprogramming. Nat Commun 2018, 9, (1), 4934.에 설명된 대로 수집 및 배양되었다. 간단히 소 난관상피세포를 100 U / mL 페니실린 및 100 µg / mL 스트렙토마이신으로 보충된 HEPES 완충 배지에서 난관의 앰플 끝에서 난관 내용물을 긁어내고 압착하여 분리하였다. 회수된 세포를 100 U / mL 페니실린 및 100 µg / mL 스트렙토마이신을 함유하는 HEPES- 완충 배지에서 5 분 동안 25 ° C에서 550 x g로 원심 분리하여 2 회 세척 하였다. 24 시간 동안 혈액 오염이 최소화 된 깨끗한 세포를 100U / mL 페니실린, 100 µg / mL 스트렙토 마이신 및 10 % 우아혈청 (fetal calf serum, FCS; Bovogen Biologicals, Melbourne, Australia) 이 보충 된 HEPES 완충 배지에서 배양하였다. 4 ° C에서 100,000xg에서 60 분 동안 FCS에서 세포 외 소포 함량을 고갈시키고 추가 사용을 위해 분주하고 -20 ° C에서 보관하였다. 이 24 시간 내에 세포는 5 분 동안 25 ° C에서 550 × g에서 원심 분리에 의해 수집된 활발하게 움직이는 섬모를 가진 부유 소포를 형성하였다. 세포를 5 µg / mL 인슐린, 5 µg / mL 트랜스페린, 10 ng / mL 표피 성장 인자, 50nM 트랜스-레티노산, 10 mM 글루타티온, 100 µg / mL 겐타 마이신, 5 % FCS 및 2.5 mg / mL 암포테리신 B로 보충된 DMEM/Ham' s F12 배지 (DMEM/F12 Glutamax I, Gibco BRL, Paisley, UK)에 현탁시켰다. 피펫을 사용하여 세포를 기계적으로 분리하였다. 이어서, 세포를 6-7 일 이내로 함유할 때까지 5 % CO2, 포화습도, 38.5 ° C의 분위기에서 6-well 플레이트에서 3 x 10⁶ Cell / mL의 최종 농도로 배양 하였다. 100 % 융합된 단일층을 PBS로 세척하고 조건 배지에 사용

하였다.

[0067] 1.2. 난관 세포의 소포의 분리 (Oviductosomes / Exosomes)

[0068] 100 % 융합된 소 난관상피세포-단일층(BOEC-monolayer)에서 얻은 조건 배지를 50 mL 원뿔형 튜브에 담았다. 엑소좀은 원심 분리 길이와 속도를 거의 변경하지 않고 조건 배지에서 순차적으로 원심 분리하여 정제하였다. 간단히 말해, 여과 된 조건 배지를 먼저 300 x g에서 10 분 동안 원심분리한 다음 10,000 x g에서 30 분 동안 죽은 세포, 잔해물 및 오염된 단백질을 제거하였다. 펠릿을 버리고 깨끗한 상청액을 (BECKMAN L8-M; SW41Ti rotor)에서 60 분 동안 4 ° C에서 100,000 x g에서 초 원심 분리하여 엑소좀을 펠릿화 하였다. 펠릿을 얼음처럼 차가운 PBS에 현탁시키고, 분취하고 -20 ° C에서 저장하여 추가 분석 및 시험관 배양 배지에 보충 하였다.

[0070] 1.3. 나노 입자 추적 (Nano-particle tracking, NTA) 분석

[0071] 데이터 캡처 및 통합에 사용된 소프트웨어는 NTA 버전 3.4 빌드 3.4.003 (Malvern, UK)를 사용하였다. 소 난관상피세포-단일층 유래 엑소좀의 분석을 위해 PBS에서 100x 희석 샘플을 사용하였다. 기기의 셀 챔버에 로드된 샘플을 셀 전체에 걸쳐 서로 다른 임의의 위치에서 각 샘플을 측정하였다. 측정은 각 위치에서 세 번을 주기로 측정하였다. 사전 평가 매개 변수는 감도 85, 점도(water) 0.9cP, 프레임 속도 25FPS(frames per seconds)로 조절되었으며, 샘플 당 총 1,498 프레임, 수동 셔터 속도 및 게인 조정이 적용된 레이저 펄스 지속 시간, 온도 25 ° C 및 7.0 pH의 100 레이저 파장 녹색 카메라 타입(sCMOS)에서 시험되었다. 획득 후 매개 변수의 조건은 최소 밝기 22, 최대 픽셀 영역 1000 및 최소 영역 10 픽셀이다. 온도, 전도도, 전기장 및 드리프트 측정과 같은 모든 품질 관리 매개 변수는 기기 최적화 설정을 적용하여 조정되었다. 입자의 직경과 크기를 나타내는 평균, 중앙값 및 모드는 시료 mL 당 입자의 분포 / 농도와 함께 데이터에서 허용이 어려운 판독 값을 제외하여 계산하였다. 그래프의 곡선은 2 차 보간법을 사용하여 입자 크기 당 입자 수를 얻었다.

[0073] 1.4. 엑소좀-단백질 정량화를 위한 엑소좀-ELISA 비색 분석

[0074] 엑소좀-단백질 농도의 정량 및 정성 분석을 위해 제조업체의 지침에 따라 (cat # K1205-100; BioVision, USA)의 double sandwich enzyme-linked immunoassay(ELISA) ExoQuant™ 비색 키트를 사용하였다. 간단히 말해서, 표준 엑소좀 및 소 난관상피세포 단일층 유래 엑소좀 샘플을 연속 희석하고 ELISA 스트립의 웰에 첨가한 다음 습한 대기 조건에서 37 ° C에서 밤새 배양하였다. 세척 후 37 ° C 인큐베이터에서 2 시간 동안 1차 항체 anti-CD9α (1x 샘플 버퍼에 희석 됨)로 배양하였다. 세척 후, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP 접합된 이차 항체와 함께 37 ° C에서 1 시간 동안 배양한다. 다음으로 내용물을 씻어 내고 어두운 조건에서 실온에서 10 분 동안 발색 기질 용액으로 배양한다. 반응종결액을 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA-reader로 450 nm 흡광도에서 OD 값을 측정하였다. 표준 곡선은 엑소좀의 해당 양에 대한 다른 표준 농도의 평균 농도 값을 플롯하여 얻었다. 표준 엑소좀 및 샘플 엑소좀의 평균 흡광도는 중복 세트로 계산되었고, OD 값의 결과는 선형 회귀 분석으로 해석되었다.

[0076] 1.5. 체외 배아 생산

[0077] 미성숙 난모세포 복합체(Immature cumulus oocyte complexes, COCs) 는 지역 도축장에서 한국 토종 한우 젖소의 난소 내 난포 (직경 2-8mm)에서 채취하여 37.5 ° C에서 생리 식염수 (0.9 % NaCl)에 보관하였다. TL-HEPES 배지는 난모세포 수집에 사용되었으며, 수집된 난모세포는 체외성숙(In Vitro Maturation, IVM) 배지가 포함된 NUNC 4 웰 플레이트(Nunc, Roskilde, Denmark)에서 22 ~ 24 시간 동안 10 % (v / v) 소 태아 혈청 (FBS), 1 μg / mL 에스트라디올-17β, 10 μg / mL 난포 자극 호르몬, 0.6 mM 시스테인 및 0.2 mM 피루브산나트륨이 첨가된, 조직 배양 배지-199 (TCM-199)에서 배양되었다. IVM 후 성숙된 COC 한우 황소 (KPN-1175, 농협, 대한민국)의 1 x 10⁶ 정자 / mL로 수정시켰다. 수정 후 약 18 ~ 20 시간 후에, 반복적인 피펫팅을 통해 추정되는 수정란을 몽쳐진 세포에서 제거하고, 완전히 박리된 수정란을 합성난관유체 (synthetic oviduct fluid, SOF) 배지에서 최대 8 일 동안 배양하였다. 체외 배양 (in vitro culture, IVC)을 지원하기 위해 44 μg / mL 피루브산나트륨(C₃H₃NaO₃), 14.6 μg / mL 글루타민, 10IU / mL 페니실린, 0.1mg / mL 스트렙토 마이신, 3mg / mL FBS 및

310 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 글루타티온이 보충된 SOF 배지를 배아 배양에 사용하였다. 38.5 ° C에서 5 % CO_2 의 가슴대기 조건 하에서 배반포 단계로 진행된 배아 발달을 기록하고 비교 분석에 사용하였다.

[0079] 1.6. 배아 배양 중 소 난관상피세포-조건배지(BOEC-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충

[0080] 배아 배양을 시작하기 48 시간 전에, 세포 배양 배지는 2 % FCS가 첨가된 필수 아미노산이 보충된 체외 성숙 배지(In vitro maturation medium, IVM) 및 합성 난관 유체 (synthetic oviduct fluid, SOF)배지로 교체되었다. 배아 발달에 대한 혈청 농도의 영향을 최소화하기 위해 최소 용량의 혈청이 사용되었다. 48 시간 후 세 가지 각각 다른 단일층의 조건 배지(condition media, CM)를 수집하였다. 3 개의 수집된 수집물을 원뿔형 튜브에 결합하고 모든 세포 조각을 제거하기 위해 10 분 동안 300 x g에서 원심 분리하였다. 조건 배지는 0.22 μm 니트로 셀룰로스 막을 통해 여과되었고, 분취하여 4 ° C 냉장고에 보관되었다. 조건 배지 유래 소 난관상피세포는 난 모세포 성숙 및 배아 배양 전에 38.5 ° C 인큐베이터에서 예열되었다. 배아의 시험관 내 발달 동안 보충을 위해, 엑소좀의 100 배 희석을 1 ~ 10 % 범위에서 테스트하였다. 3 % 엑소좀의 보충은 최대 배아 발달을 지원하는 것으로 관찰되었다. 추가 실험 분석을 수행하기 위해 3 % 엑소좀 농도가 사용되었다. 8 일째에 소 난관상피세포 유래-조건배지 및 소 난관상피세포 유래-엑소좀 배지에서 배반포 단계로 발달 된 배아의 수를 기록하였다. 그 후, 배반포를 1 x PBS에서 3 회 세척하고 추가 실험 분석을 위해 라이브로 사용하거나 4 % 파라포름알데히드에 고정하였다. 유전자 발현 패턴의 경우, 뉴클레아제가 없는 물에서 세척된 배반포를 즉시 액체 질소에서 급속 냉동하고 에펜돌프 튜브에 -80 ° C에서 보관하였다.

[0082] 1.7. RNA 추출 및 Real-Time PCR

[0083] 배반포의 총 RNA (그룹당 n = 5)는 RNA 분리 키트 (PicoPure, Arcturus, ThermoFisher, Foster City, CA, US A)로 분리하고, iScript 역전사 효소 (BioRad)를 사용하여 cDNA를 합성하는 데 사용하였다. qRT-PCR 분석은 모든 유전자의 상대적 mRNA 풍부도는 Cyclex BioRad 시스템을 사용하여 SYBR Green master mix를 사용한 실시간 정량 (q) RT-PCR로 분석되었다. 테스트된 유전자의 역치 (Ct) 값 정규화는 GAPDH의 (Ct) 값으로 수행되었다. PCR 증폭에 사용된 조건은 94 ° C에서 5 분 동안 초기 변성 후 30 초 동안 94 ° C, 30 초 동안 58 ° C, 30 초 동안 72 ° C의 40 주기로 이루어졌다 mRNA 발현 패턴 분석을 위해 4 회 반복하여 3 회 독립적인 실험을 수행하였다.

[0085] 1.8. ROS 분석

[0086] 형광 프로브 2 ', 7'-dichloro dihydro fluorescein diacetate 분자 (DCHDFA, Sigma D-6883 Aldrich)는 ROS (활성산소종)생성 분석에 사용되었다. 스톱 용액 준비 및 분석 프로토콜은 8 일째 배반포를 수집하고 PBS / 폴리비닐피롤리돈 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 용액으로 세척하고 10mM / mL 농도의 DCHDFA 용액에서 37 ° C에서 30 분 동안 배양하였다. 30 분 배양 후, 배반포를 세척하고 공초점 레이저 현미경 (Olympus, FV1000, Tokyo, Japan)으로 ROS 수준 형광 방출을 시각화하였다.

[0088] 1.9. 세포 증식 및 세포 사멸 분석

[0089] 세포 증식 및 DNA 단편화에 대한 시험관 내 배양 조건의 영향은 anti-BrdU 라벨링 및 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 20-deoxyuridine, 50-triphosphate (dUTP) nick-end labeling (TUNEL)분석으로 In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 확인되었다. 세포 증식 분석을 위해, 8 일째 배반포를 세척하고 37 ° C에서 100mM BrdU로 6 시간 동안 배양하였다. 배반포를 고정하고, 투과시키고 30 분 동안 실온 (RT)에서 1N HCL 용액과 함께 배양하였다. 3.0 % BSA (bovine serum albumin)로 1 시간 차단한 후, anti-BrdU (B8434-100 μL , Sigma) 1 차 항체에 이어 2 차 TRITC-접합 항체와 함께 배양하여 BrdU 표지된 세포를 검출하였다.

[0090] 세포사멸 지수를 확인하기 위해, 8 일째 배반포를 4 % PFA (paraformaldehyde)에 15 분 동안 고정시켰다. 0.5 % (v / v) Triton X-100 및 0.1 % (w / v) 나트륨 시트레이트로 실온에서 30 분 동안 세척 및 투과되었다. 그 후, TUNEL 분석 키트 시약과 함께 37 ° C에서 1 시간 동안 차광 조건에서 배양하였다. 핵 염색을 위해 DAPI (5

분)로 세척하고 배양하였다. 세척 후 배반포를 유리 슬라이드에 장착하고 이미지를 표면 형광 현미경 (Olympus IX71, Tokyo, Japan)으로 캡처하였다. Image J 소프트웨어 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 각 배반포에서 BrdU 및 TUNEL 표지된 양성 핵을 계산하였다. 평균 핵분율은 총 세포 수 (DAPI로 염색)를 나누어 산출하였다.

[0092]

1.10. 지질 함량 정량화를 위한 Nile Red 염색

[0093]

세포 내 지질 검출에 특이적인 형광 프로브 (Nile red, NR)를 사용하여 8 일차 배반포에서 지질의 축적량을 평가하였다. 사용된 프로토콜은 고정된 배반포를 PBS / PVP 용액으로 세척하고 어두운 조건에서 실온에서 3 시간 동안 10mg / mL NR 용액과 함께 배양하였다. 그 후, NR 염색 된 배반포를 PBS / PVP 용액으로 세척하고 핵 염색을 위해 DAPI (5 분)와 함께 배양 하였다. 공 초점 레이저 스캐닝 Olympus Fluoview FV1000 현미경은 유리 슬라이드에 장착된 배반포의 이미지를 캡처하는 데 사용되었다. NR 친유성 특이적 프로브를 나타내는 적색 형광 강도는 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정되었다.

[0095]

1.11. JC-1 염색

[0096]

형광 색소 염료 JC-1 (Molecular probe, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 시험관 내 배양 된 배반포의 미토콘드리아 막전위 (Ψ)를 측정하였다. 8 일째 배반포를 수집하고 4 % PFA에 고정하였다. 어두운 조건에서 37 ° C에서 1 시간 동안 PBS / PVP 용액에 준비된 10mg / mL JC-1 염료로 세척하고 배양하였다. 기본적으로 염료는 미토콘드리아에 흡착되고 낮은 막 전위를 나타내는 단량체 (J-monomer)를 형성하여 녹색 형광 신호를 생성하거나 높은 막 전위를 나타내는 응집체 (J-aggregate)를 형성하여 적색 형광 신호를 생성한다. 그 후 배반포를 PBS / PVP 용액으로 세척하고 DAPI로 5 분 동안 염색 하였다. 세척 후 배반포는 커버 슬립이 있는 유리 슬라이드에 장착되었다. 이미지는 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 (Olympus, FV1000, Tokyo, Japan)으로 관찰되었다.

[0098]

1.12. 통계 분석

[0099]

배아 발달 데이터의 통계적 차이는 SPSS 소프트웨어 버전 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 분석되었다. 모든 배아 핵분위 수 데이터는 평균 $\pm$ 평균 표준 오차 (SEM)로 표시되었다. 이미징 데이터의 분석을 위해 실험을 세 번의 실험 세트로 수행하고 단일 배반포 이미지를 개별 그룹의 대표 이미지로 표시하였다. 모든 그래픽 데이터는 세 번의 실험 세트에서 선별된 평균 표준 오차 (SEM)로 표시된다. 모든 이미징 데이터에 대해 평균 형광 강도는 개별 그룹의 BL (n = 20) 당 정량화되었으며 히스토그램 값은 Image J 소프트웨어 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정되었다. 모든 그룹의 다양한 유전자 발현 수준의 차이와 형광 강도 검출의 차이는 일원 분산 분석에 이어 Sidak의 다중 비교 테스트를 통해 분석되었다. GraphPad Prism 6.0 소프트웨어 패키지(USA)가 사용되었다. p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001, 유의한 차이로 간주되었다.

[0101]

<실시예 2> 결과

[0102]

2.1. 난관상피세포 단일층 전형적인 상피 세포 형태 및 특성의 유지

[0103]

배아의 체외 생산 중에 생체 내와 같은 미세 유체 환경을 모사하기 위해, 먼저 정의된 조건 배지에서 소 난관상피세포(BOECs)를 7 일 동안 단단히 결합된 단일층을 형성할 때까지 분리하여 안정적으로 배양하였다 (도 1A). 난관 상피는 섬모 세포와 분비 세포의 풍부한 집단으로 이루어진다. 자연적 특징과 유사하게, 광학 현미경의 결과는 소 난관상피세포(BOECs)의 첫 24 시간 배양 동안 세포 응집체를 보여주었으며, 분비 및 섬모 세포 집단의 전형적인 형태는 모든 세포 응집체의 정점 표면에서 격렬하게 움직이는 섬모의 존재에 의해 검출되었다(도 1B). 상피 극성(Epithelia polarization)은 세포가 6-7 일 배양 기간 동안 일관되게 성장하고, 마지막으로 단단하게 융합성 단층 시트로 정착할 수 있다(도 1C). 배양된 소 난관상피세포는 상피 계통, 세포 배양 순도 및 증식 가능성을 결정하기 위한 여러 마커의 존재를 추가로 하는 특성이 있다. CD44 및 EP-CAM의 강력한 발현은 세포가 상피 유래임을 나타냈다. CD34 및 CD14의 비검출 발현은 분리된 소 난관상피세포 배양 집단에서 조혈 전구 세포의 부재를 나타낸다. 또한 c-MYC 및 OCT4의 존재는 세포가 6-7 일 배양 기간 동안 증식 잠재력을 유지하는 방법

을 설명하였다 (도 1D). 또한, 소 난관상피세포-단층의 기능적 형태는 난관 특정 유전자 제작자의 발현에 의해 추가로 검증되었다. 결과는 소난관상피세포- 단층이 배양 기간 동안 난관 유전자 마커 처리량 특성을 유지했음을 보여준다. 발현이 약간 하향 조절되었지만 장기 배양 동안 통계적 차이가 없었다(도 1E). 이러한 모든 결과는 소 난관상피세포-단층의 전형적인 생리적 특징에 대한 증거를 제공하고 시험관 내 프로세스 동안 난관 세포 배양 시스템의 적절히 유지됨을 시사한다.

[0105] 2.2. 난관 분비체는 난관 세포의 소포(oviductosomes) / 엑소좀(exosomes)이 풍부하다.

[0106] 다음으로 난관 상피 세포 분비가 초기 배아 발달에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 생체 내에서 난관 내강 유체는 초기 배아 발달에 영향을 미치는 다양한 분비 인자가 풍부하다. 이식 전의 발달 중에 엑소좀(exosomes)의 효과를 독립적으로 결정하기 위해, 우리는 체외 배양 된 소 난관상피세포 단층에서 얻은 엑소좀의 생물 물리학적 및 분자적 특성화를 수행하였다(도 2). 나노 입자 추적 분석 (Nanoparticle tracking analysis, NTA)을 수행하여 소 난관상피세포-단일층 유래 엑소좀의 크기와 농도를 확인하였다. 분석 결과 엑소좀은 크기가 80 ~ 150nm 사이이고 평균 농도가 mL 당 3×10^8 particles 이다(도 2A). 입자의 크기와 분포도 강도 측면에서 NanoSight LM10으로 캡처한 스크린샷에 표시된 대로 시각화하여 나타내었다.(도 2B). 또한, 소 난관상피세포-단일층 유래 엑소좀의 농축은 Exo-ELISA 비색 분석을 통해 CD9 엑소좀 특이 항체로 추가로 확인하여 정량화하였다(도 2C-D). 이 모든 결과는 시험관 내 배양된 소 난관상피세포-단일층이 기능적 상태로 잘 유지될 수 있고, 그 분비가 풍부한 엑소좀을 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0108] 2.3. 소 난관상피세포에서 유래된 조건 배지 및 엑소좀은 배아 발달 차단을 감소시키고 시험관 내 생산된 배반포의 품질 및 수율을 향상시킨다.

[0109] 난관 분비가 초기 배아 발달에 어떻게 영향을 미치는지 더 잘 이해하기 위해, 소 이식 전 체외 배양된 소 난관상피세포 발달 과정에서 생성된 소 난관상피세포의 단일층에서 유래 난관 소체/엑소좀을 조건 배지에서의 실제 적용하여 확인하였다. 표 1 및 도 3A에 표시되니 바와 같이 배반포 수율 및 부화 능력 (BOECs-CM : 각각 43.6 ± 0.86 ; 37.5 ± 0.85)이 눈에 띄게 개선되었다. 소 난관상피세포(BOEC)에서 유래된 엑소좀(Exosome)의 보충은 농도 의존적으로 배아 발달에 영향을 주는 것으로 보여주었다.

표 1

Table 1. Effect of BOECs condition media on embryonic development during in vitro						
Groups	BOECs-CM: TCM199/SOF (Serum 2%)	Oocytes, n	Presumptive Zygote, n	Cleaved Embryos, n %	Total BL %	Hatched BL %
Control	(-)	457	430	335 (77.9 ± 0.28)	120 (28.2 ± 0.26) ^a	44 (36.0 ± 1.87)
BOECs-CM	(+)	504	478	373 (78 ± 0.31)	208 (43.6 ± 0.86) ^b	78 (37.5 ± 0.85)

^{a,b} $p > 0.05$ with different superscripts indicates significant difference.

[0111] 예를 들어, 성숙 및 배아 배양 중에 3 %의 부피 비율로 엑소좀을 첨가하면 표 2, 도 3B, 도 3C와 같이 배반포 형성 속도 및 배반포 부화 능력 (BOECs-Exo : 각각 45.4 ± 0.68 ; 48.9 ± 0.97) 측면에서 배아 품질이 크게 향상되었다.

표 2

Table 2. Effect of different dilutions of BOECs Exosomes and BL yield during in vitro

Groups	BOECs-Exo Dilutions (%)	Oocytes, <i>n</i>	Presumptive Zygote, <i>n</i>	Cleaved Embryos, <i>n</i> %	Total BL %	Hatched BL %
Control	(-)	328	313	245 (78.4 ± 0.18)	89 (28.6 ± 0.26) ^a	29 (32.4 ± 1.45) ^a
BOECs-Exo	1	339	323	255 (78.9 ± 0.23)	120 (37.3 ± 0.49) ^c	50 (41.8 ± 0.96) ^{bc}
	2	347	330	259 (78.6 ± 0.18)	133 (40.3 ± 0.49) ^c	61 (45.8 ± 1.21) ^{cd}
	3	351	334	263 (78.6 ± 0.18)	151 (45.4 ± 0.68) ^d	74 (48.9 ± 0.97) ^d
	5	346	328	257 (78.4 ± 0.26)	105 (32.3 ± 1.32) ^b	39 (36.8 ± 1.69) ^{ab}
	10	332	315	246 (78.4 ± 0.18)	90 (28.6 ± 0.71) ^a	31 (33.0 ± 1.27) ^a

^{a,b,c,d} *p* > 0.05 with different superscripts indicates significant difference.

[0112]

[0114] 또한, 8-16 세포기 단계의 배아 발달은 BOECs-CM 및 엑소좀 모두의 보충으로 현저하게 향상되었다.

[0115] In Vitro 유래 소 난관상피세포 분비물이 발달 및 이식 조절 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, BOECs-CM 및 엑소좀의 존재하에 배양된 배반포의 q-RT-PCR 분석을 수행하였다.

[0116] 결과는 소 난관상피세포의 분비 환경이 대조군 배아에 비해 BOECs-CM 및 엑소좀 보충 배지에서 생성된 배아에서 다양한 발달 및 이식 가능성 관련 유전자 발현을 현저하게 향상시키는 것으로 나타났다(도 3D). 배아의 품질을 추가로 평가하기 위해 총 세포 분포도를 확인하였다. 분석은 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀 유래 배아가 대조군 배양 배지에서 발달된 배아보다 유의하게 더 높은 세포 증식 비율을 갖는 것으로 나타났다(도 3E, F). 이러한 모든 결과는 체외 배양된 소 난관상피세포의 조건 배지 및 엑소좀이 체내 난관 플러싱을 모사하고 소 배아 생산을 위한 체외 배양 조건에 유익한 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0118] 2.4. 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosomes)과 배아의 공동 배양은 세포 스트레스를 줄이고 세포 생존율을 향상시킨다.

[0119] 체외 유래 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosomes) 소 배아의 이식 전 발달 과정에 세포 산화 스트레스 및 손상에 미치는 영향을 확인하기 위해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 수준을 측정하였다. 소 난관상피세포-조건배지 및 엑소좀을 첨가한 소 배아는 대조군 배양 배지의 배아에 비해 체외 배양 기간 동안 ROS 수준이 현저하게 후행하여 상승하는 것을 확인하였다 (도 4A). ROS 형광 강도의 정량화는 도 4B에 표시하였다. 동시에, 잘 알려진 항산화 효소의 mRNA 함유도를 조사하였다. 분석은 소 난관상피세포-조건배지 및 엑소좀의 존재하에 배양된 배아가 난관상피세포-조건배지 및 엑소좀의 보충없이 배양된 배아에 비해 훨씬 더 높은 항산화 관련 전사체 발현이 나타났다 (도 4C).

[0120] 다음으로, DNA 손상 수준을 테스트하기 위해 각각의 세포 사멸 분석을 수행하였다. 결과는 기존 배양 배지에서 발달된 대조군 배아에서 더 많은 TUNEL 양성 핵을 나타내는 반면, BOEC-CM 및 Exo 보충은 형광 이미징 중에 세포 사멸 세포를 현저히 감소시키는 것으로 나타났다 (도 4D). 평균 TUNEL 양성 핵 대 총 세포 수의 정량화는 도 4E, 도 4F에 나타내었다. 또한 세포 사멸 및 손상에 대한 영향은 항-세포사멸 마커 유전자의 발현을 추가로 확인하였다. 이러한 결과는 소 난관상피세포-조건배지(BOEC-CM) 및 엑소좀(Exosomes) 보충 그룹에서 BCL2 및 BAX의 더 높은 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 배아에서 세포 자멸사 발생을 억제했음을 시사한다 (도 4G). 또한, 이러한 결과는 소 난관상피세포 분비물이 보호 역할을 하는 몇 가지 추가 인자를 포함하고, 시험관 내 연장된 배양 기간 동안 조기 발달된 소 배아에서 세포 생존율을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[0122] 2.5. 소 난관상피세포(BOEC)에서 유래된 조건 배지 및 엑소좀(Exosome)은 피루베이트 흐름을 재구성하고 체외에서 생산된 배아 대사를 개선한다.

[0123] 지방산 산화 (Fatty acid oxidation, FAO) 대사의 이용에 대한 소 난관 상피세포-조건배지 및 엑소좀의 효과를 분석하기 위해, 먼저 대조군과 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충 그룹에서 체외 배양된 배아의 지질 함량을 측정하였다. 지질 특이적 형광 프로브에 의한 공초점 이미징은 소 난관상피세포-조건

배지(BOECs-CM) 보충 배반포가 대조군 배반포와 동일한 지질 함량을 갖는 반면 엑소좀(Exosome) 보충은 발달 배아에서 지질 방울을 상당히 산화시킨다는 것을 보여주었다(도 5A). 형광 강도는 도 5B에 표시하였다. 이 분석을 확인하기 위해 여러 지질 대사 유전자의 발현을 평가하였다. qRT-PCR 분석은 대조군 및 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 배양 배아에서 PPAR α , CPT1 및 PDK4의 발현이 통계적으로 다르지 않음을 보여 주었다. 흥미롭게도 엑소좀(Exosome) 보충은 CPT1 발현의 상당한 증가와 PDK4 발현에 대한 억제 효과를 가져 왔다(도 5C). PDK4는 피루베이트(pyruvate)가 트리카르복실산(tricarboxylic acid, TCA) 사이클로 유입되는 것을 조절하는 포도당과 지방산 대사의 주요 조절 효소이다.

[0124] 더하여, TCA 사이클 대사 유전자 발현의 변화를 확인하는 분석을 수행하였다. 분석 결과 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충은 피루베이트 탈수소효소 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 및 글루타메이트 탈수소 효소 1 (glutamate dehydrogenase 1, GLUD1) 발현을 크게 향상시키는 반면, Sirt4 유전자의 발현을 하향 조절했으며, 엑소좀 단독 보충군에서 상당한 효과가 나타났다(도 5D). 계략적인 모델에서, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)을 첨가하여 배양된 이식 전 배아에서 Sirt4 및 PDK4 발현의 억제가 TCA 대사 효소의 발현을 상향 조절함으로써 TCA 사이클로의 피루베이트의 유입을 개선 할 수 있다. PDH와 GLUD1은 모두 TCA 사이클에 연료를 공급하여 궁극적으로 이식 전의 배아 발달 단계를 지원하기에 충분한 에너지를 제공한다. (도 5E).

[0126] 2.6. 소 난관상피세포-조건 배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 매개 대사 흐름은 배아 발달 동안 미토콘드리아의 기능을 향상시킨다.

[0127] 소 난관상피세포-조건 배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충하에 배양된 배아 발달에서 TCA 사이클 대사의 개선함을 제시한 결과를 기반으로, 본 실시예에서는 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Psi_m$)를 분석하여 미토콘드리아 기능을 밝히는 것을 목표로 하였다. 결과는 대조군 배아 그룹 대 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충 그룹에서 미토콘드리아 활성에서 현저한 차이를 나타내었으며, 이는 더 높은 J- 옴집체 비율을 보여주었다 (도 6A). 미토콘드리아 막전위($\Delta \Psi_m$) 형광 강도의 양적 차이는 도 6B에서 볼 수 있다. 또한 여러 미토콘드리아 산화적 인산화(Oxidative phosphorylation, OXPHOS) 서브 유닛 유전자의 발현과 ATP 합성 마커를 분석하여 미토콘드리아 대사 활성을 확인하였다. 미토콘드리아 막전위 ($\Delta \Psi_m$)와 유사하게, 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충 배지의 존재 하에서 배양된 배아는 대조군 배양 배지 배아에 비해 여러 미토콘드리아 산화적인산화(mito-OXPHOS) 서브 유닛 유전자의 현저하게 더 높은 발현 프로파일과 ATP 합성 효소의 증가된 mRNA 전사를 보여 주었다(도 6C). 이러한 모든 결과는 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)이 체외 배양 조건에 큰 영향을 미치고 자체 대사를 구축하도록 도와줌으로써 생산하는 배아의 질을 크게 향상시킨다는 것을 보여준다.

[0129] <실시예 3> 검토

[0130] 본 발명에서, 체외 배아 발달을 지원하기 위해 소 난관상피세포(BOECs) 가단일층(monolayer)으로 이루어진 조건배지 및 소 난관상피세포(BEOC) 유래 엑소좀의 공동 배양 시스템의 이용을 설명하였다. 본 연구에서 소 난관상피세포의 체외 배양에 대한 체계적인 접근 방식과 특히 소 난관상피세포에서 유래된 엑소좀의 소난관상피세포의 분비물 사용이 표준 체외 생산(In Vitro Produced, IVP) 조건을 개선 할뿐만 아니라 생체 내에서 가용성 인자가 초기 배아 발달 과정에 도움을 준다는 것을 보여주었다.

[0132] 이전 연구에서는 소 난관상피세포가 혈청이 없을 때 기능적 상태로 유지될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나 FCS가 없는 배지에서 분비 과립의 손실과 같은 일부 형태학적으로 퇴행하는 특징을 보여 주었다. 특징적인 분비 기능의 중요한 손실을 피하기 위해, 완전한 성장 표준 배양 배지에서 소 난관상피세포를 배양하였다. 소 난관상피세포 시트는 최대 7 일의 배양 기간 동안 잘 유지되었으며, 분석 결과 전형적인 상피세포 특징과 형태를 가진 완전한 기능적 생물학적 활성을 갖는 것으로 나타났다(도 1).

[0133] 따라서 혈청의 첨가는 증식하는 세포의 더 나은 부착을 허용할 뿐만 아니라 소 난관상피세포의 체외 배양 중에 필요한 것으로 확인되었다. 반면에 고농도의 혈청은 낮은 배아 생산 품질, 조기 배아 사망으로 이어지는 세포 사멸 발생률이 높거나 여러 가지 발달 기형이 있는 태아와 관련이 있다. 따라서, 배아 품질에 대한 혈청의 영향을 최소화하기 위해, 본 발명에서는 48 시간 동안 잘 정착된 100 % 융합 소 난관상피세포 단일층의 성장을 지원

하기에 충분할 만큼 조건 배지를 생산을 위하여 FCS (2 %)의 농도를 줄였다. 결과는 소 난관상피세포-조건배지 (BOECs-CM)에서 배반포의 형성 속도를 현저하게 향상시킬 뿐만 아니라 대조군에 비해 부화 능력과 같은 배반포의 품질을 손상시키지 않는 것으로 나타났다 (표 1 및 도 3A). 이러한 결과는 낮은 농도의 FCS (2.0 %)가 각각 냉동 보존 및 배아 이식 후 배반포의 생존 및 수태율을 방해하지 않는다는 것을 보여준다.

[0135] 배아 압축에서 배반포 단계에 이르기까지 난관 유체의 영양분이 난관-배아 상호작용을 유지함으로써 배아 대사의 전달에 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 난관 소체 / 엑소좀은 배아-모체-누화를 형성하는 난관 유체에 존재하는 주요화물로, 내강액에서 영양분을 더 잘 이용하고 배아가 자신의 신진 대사를 구축하도록 돕는다. 소 난관상피세포-엑소좀 단독 보충 그룹의 결과는 농도 의존적으로 초기 배아 발달에 상당한 유익한 효과를 보인 반면, 엑소좀의 과도한 농도는 3 % 이상으로 배반포의 발달 및 부화율을 손상시켰다(표 2 및 도 3B, C). 배양 배지에 과도한 엑소좀의 농도가 존재하면 배아 발달에서 착상전 기간 동안 교란된 대사 경로가 발생할 수 있다. 대사 조절은 배아와 환경의 상호 작용을 고려할 때 중심적인 역할을 한다. 흥미롭게도, 시험관내(In vitro) 유래 소 난관상피세포-엑소좀(BOECs-Exo)의 보충은 시험관내 배양된 소 배아 발달 동안 대사 관련 유전자 발현에 현저한 영향을 미쳤다. 난관 내 배아 발달 동안 난관 유체의 영양성분은 자유 라디칼 소거 단백질을 분비하거나 산화 손상으로부터 보호하기 위해 항산화 효소 수준을 조절하여 산화 스트레스로부터 발달중인 배아를 보호한다. 교란된 산화 환원 균형과 불충분한 항산화 수준은 궁극적으로 세포 사멸을 가속화하고 배아의 품질을 저하시키는 DNA 단편화의 주요 원인이다. 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exo)을 추가하면, ROS 수준의 생성과 여러 산화 대사 유전자의 발현 및 세포 아포토시스 비율이 현저하게 감소하였다(도 4A-C). 이는 발달중인 배아가 배양 배지에서 영양분의 가용성으로 인해 산화에서 해당 대사로 에너지 사용을 전환했을 수 있음을 반영한다.

[0136] 난모세포가 성숙하고 포유류 배아가 발달하는 동안, 지방산의 산화는 ATP를 아세틸-CoA로 전환시켜 더 많은 양의 에너지를 ATP 형태로 제공한다. 지질 방울 축적 및 지방산 산화(FAO) 대사 유전자의 발현에 대해 분석할 때 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)으로 보충된 시험관 내 배양된 배반포는 두 그룹 모두 유사한 발현 패턴을 보였지만, 효과는 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome) 보충 그룹에서 훨씬 더 두드러졌다(도 5). 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM)을 준비하는 동안 혈청을 추가하면 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 유래 배아에 축적된 지질 방울이 존재하는 이유를 설명할 수 있다. PPAR α 및 CPT1과 같은 주요 지방산 산화 (FAO) 대사 조절 유전자 발현은 엑소좀을 단독으로 처리 된 배반포에서 높게 상향 조절된다. 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM)과 대조군 사이의 통계적으로 유의미한 차이는 배양 배지에서 혈청의 효과를 반영 할 수 있다. 이것은 소 난관상피세포에서 유래된 분비물이 PPAR α 와 CPT1 발현을 촉진함으로써 발달중인 배아에서 지방산 산화(FAO) 대사를 조절하는 방법이 설명된다. PPAR α 는 CPT1의 상류 조절자이며 CPT1 유전자의 프로모터 영역에 있는 PPAR 반응요소와 결합하여 전사를 자극하는 것으로 밝혀졌다, 분석 결과 두 유전자의 mRNA 발현이 동시에 증가하는 것으로 나타났다. 대사 경로의 주요 조절 효소는 PDK4이며, PDK4는 피루베이트 탈수소효소 (pyruvate dehydrogenase, PDH)의 억제를 통해 TCA 회로로 유입되는 피루베이트의 양을 조절하여 대사 흐름을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PDH는 피루베이트의 아세틸-CoA(acetyl-CoA)로의 전환을 조절하는 주요 효소이며, 발달중인 포유류 배아의 대사 요구를 충족시키기 위해 더 많은 양의 ATP를 합성하게 한다. 놀랍게도 소 난관상피세포 유래 엑소좀의 보충은 업스트림 억제제 PDK4 및 SIRT4를 차단하여 PDH의 발현을 크게 향상시킨다(도 5C, D). Sirt4는 PDH와 GLUD1의 업스트림 억제제인데, PDH 및 GLUD1의 향상된 발현은 PDK4 및 SIRT4 억제 블록의 제거를 시사하며, 궁극적으로 피루베이트 흐름을 회복시켜 배아 이식 전 발달중에 TCA회로의 구축을 촉진한다.

[0138] 본 발명에 따르면 해당 대사 경로에 대한 효과는 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 보충 그룹보다 엑소좀(Exosome) 단독 처리 그룹에서 더 두드러졌다. TCA 회로의 대사 유전자 발현 상향 조절은 미토콘드리아 건강을 개선을 의미한다. 본 발명에서 미토콘드리아 대사 활성은 소 난관상피세포-조건배지(BOECs-CM) 및 엑소좀(Exosome)를 함께 보충한 배지에서 배양되는 배아에 크게 향상되었다. 배아는 산화적인산화(OXPHOS) 및 ATP 합성 유전자의 발현이 현저하게 높았다(도 6). 이러한 점은 소 난관상피세포(BOEC) 유래 조건 배지와 엑소좀이 시험관 내에서 생산된 소 배아의 미토콘드리아 건강을 개선하는데 영향을 미친다는 것을 보여준다.

[0139] 결론적으로, 체외 배양된 소 난관상피세포(BOECs)-유래 조건배지 및 엑소좀의 대사 흐름 향상 메커니즘을 나타내며, 몇몇 TCA-사이클 대사 유전자의 발현은 대사 경로를 통한 분자 흐름과 동일하지 않아서 신진 대사와 체외

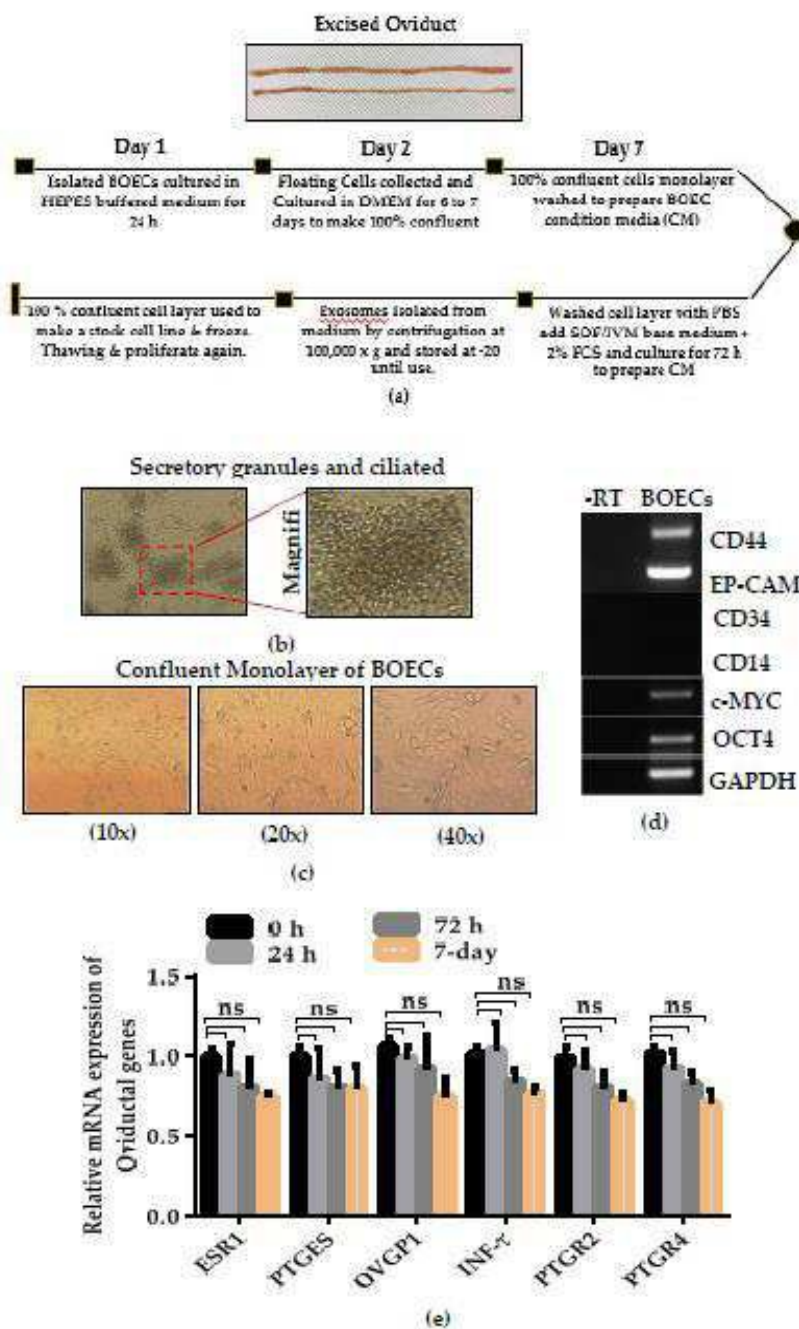
조건 동안 더 나은 배아 발달로 이어진다.

[0140]

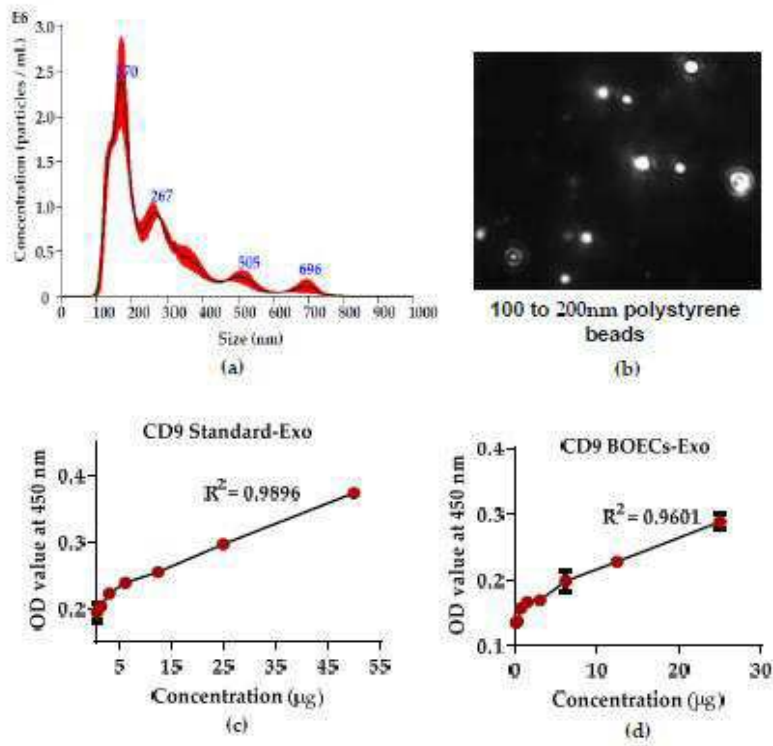
이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터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

도면

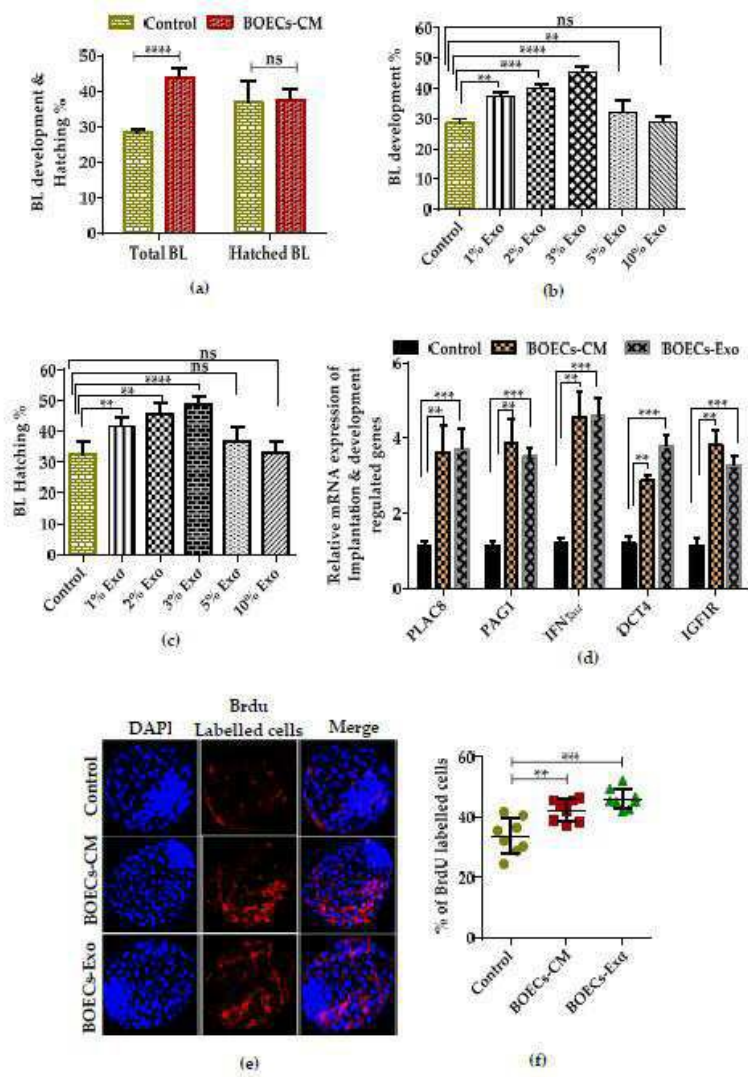
도면1



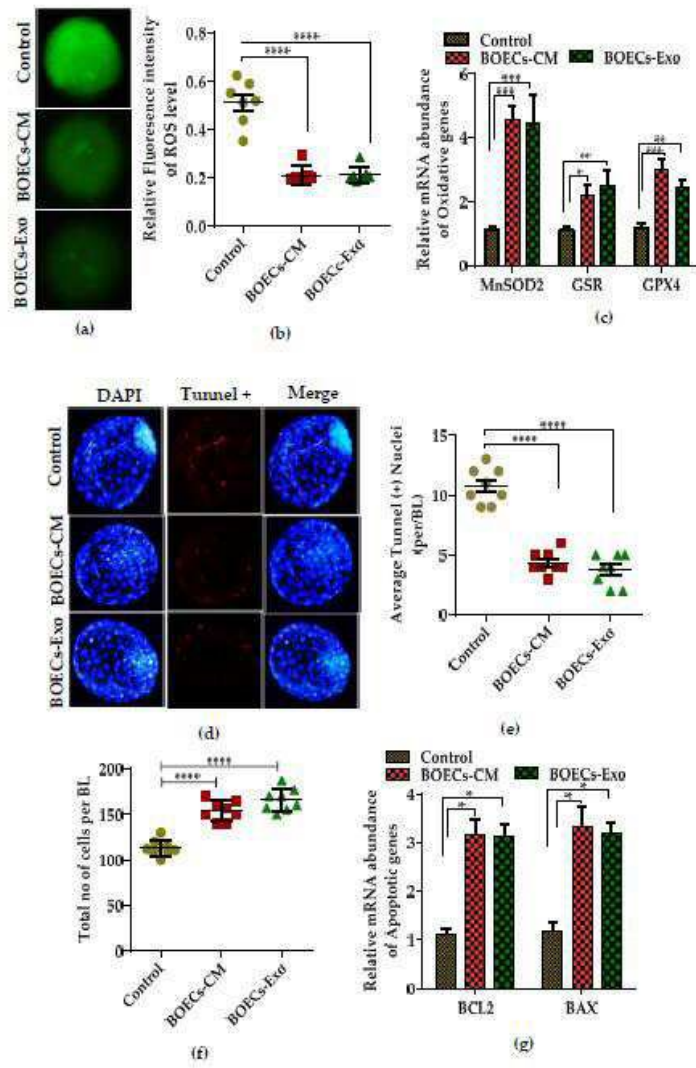
도면2



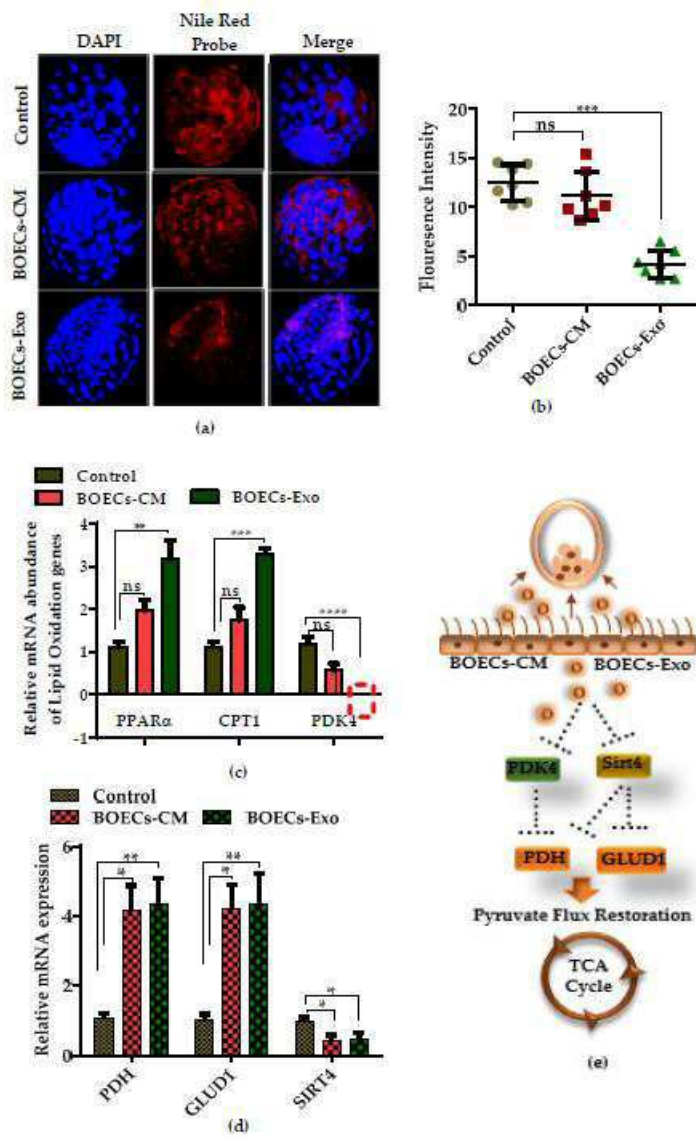
도면3



도면4



도면5



도면6

