(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0057675
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0138153
(22) 출원일자 2022년10월25일
심사청구일자 2022년10월25일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
주식회사 바이오솔루션
서울특별시 서초구 논현로 121, 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층 (양재동, 두일빌딩)
(72) 발명자
신영주
서울특별시 강남구 도산대로70길 25, 201동 801호(청담동, 청담2차 e편한세상아파트)
김준호
서울특별시 노원구 공릉로 232, 서울테노파크 519호
유가은
서울특별시 노원구 공릉로 232, 서울테노파크 519호
(74) 대리인
특허법인본

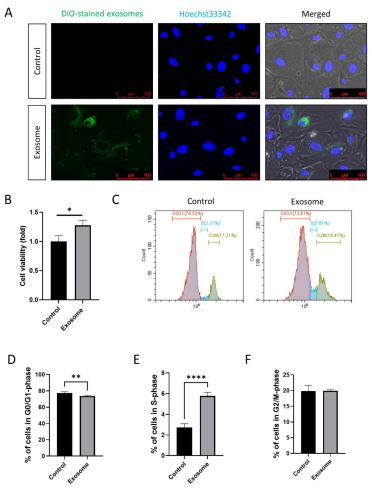
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **지방유래 중간엽줄기세포로부터 유래한 엑소좀을 포함하는 각막내피세포 질환 치료 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 목적은, 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 각막내피세포 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명의 다른 목적은, 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 27/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 TGF-β 또는 산화 스트레스에 기인하는 것인, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 각막 혼탁 질환인, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 엑소좀은 TGF-β 또는 산화 스트레스에 기인한 노화(senescence)를 억제하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 엑소좀은 N-카드헤린 발현을 억제하여 내피-중간엽 전이(endothelial-mesenchymal transition; EMT)를 억제하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 엑소좀은 미토콘드리아 기능을 조절하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 엑소좀은 자가포식을 억제하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 엑소좀은 TGF-β 또는 산화 스트레스에 기인한 노화(senescence)를 억제하는, 각막내피세포(corneal

endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 엑소좀은 N-카드헤린 발현을 억제하여 내피-중간엽 전이(endothelial-mesenchymal transition; EMT)를 억제하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

상기 엑소좀은 미토콘드리아 기능을 조절하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물.

청구항 12

지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 치료 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 각막내피세포 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간 각막내피세포(Human corneal endothelial cells; hCEC)는 생체 내에서 재생되지 않으며 과도한 손실은 각막 이식을 필요로 하는 각막 상실을 초래한다. CEC를 보호하고 재생하는 것이 각막 내피 질환의 주요 치료 목표이다. 그러나 이러한 치료법은 아직 개발되지 않았다. CEC의 병인에는 산화 스트레스, 소포체(ER) 스트레스 및 치료를 위한 RNA 독성 경로가 포함된다. 생체 내 CEC에 의해 나타나는 G0/G1 단계의 세포 주기 정지가 노화(senescence)와 유사하기 때문에 노화 억제는 치료 전략이 될 수 있다. 그러나 CEC 재생에 중점을 둔 치료법은 개발되지 않았다.

[0003] 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSC)는 자가 재생 및 다계통 분화가 가능한 기질 세포이다. MSC의 면역 조절 및 재생 효과는 측분비 활성에 의해 매개된다. MSC는 사이토카인 및 IL-1, IL-10, 종양 괴사 인자 자극 유전자-6(tumor necrosis factor-stimulated gene-6; TSG-6), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor; FGF), 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor; HGF) 및 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor; PDGF)와 같은, 포스포이노시티드 3-키나아제/AKT, 야누스 키나아제(Janus kinase; JAK)/신호 변환기 및 전사 활성화 인자(signal transducer and activator of transcription; STAT)를 포함한 여러 신호 전달 경로 및 생존, 증식, 항세포자살 및 세포외 기질 리모델링을 촉진하는 미토겐 활성화 단백질(mitogen-activated protein; MAP) 키나아제 경로를 활성화하는 성장 인자를 포함하여, 생물학적으로 활성 분자를 분비한다. 엑소좀은 보고된 바에 따르면 MSC의 측분비 효과 및 세포-세포 소통에 관여하는 많은 생물학적 유체에 존재하는 세포 유래 소포이다.

[0004] 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC)는 사이토카인, 성장 인자, 단백질 및 세포외 소포체를 분비하며 조직 재생 잠재력이 크다. 지질, 비암호화 RNA, 마이크로 RNA, DNA, 열 쇼크 단백질 및 샤페론을 함유하는 ASC 유래 엑소좀은 염증, 노화, ER 스트레스 및 산화 스트레스를 조절하여 허혈성 손상을 완화하고 조직과 기관을 재생시킬 수 있다. 이들은 잠재적인 치료 응용 프로그램이 있는 것으로 보고되었다. 그러나 CEC에 대한 ASC 유래 엑소좀의 효과 및 작용 기전은 불분명하다. 따라서 본 발명자들은 TGF-β(transforming growth factor-β) 또는 산화 스트레스가 CEC의 재생을 억제하는 노화를 유도한다는 것을 밝혀냈다. 본 발명자들은 TGF-β/산화 스트레스 유발 노화를 억제하여 CEC 재생을 촉진하는 ASC 유래 엑소좀의 측분비 효과를 추가로 조사했다. 또한, 본 발명자들은 ASC-엑소좀에서 파생된 miRNA를 확인하고 세포 메커니즘을 분석했다. 본 발명은 CEC에 대한 새로운 치료 전략을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허제10-1887432호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은, 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 각막내피세포 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은, 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀을 포함하는 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 질환은 TGF-β 또는 산화 스트레스에 기인하는 것일 수 있다.

[0011] 상기 질환은 각막 혼탁 질환일 수 있다.

[0012] 상기 엑소좀은 TGF-β 또는 산화 스트레스에 기인한 노화(senescence)를 억제하는 것일 수 있다.

[0013] 상기 엑소좀은 N-카드헤린 발현을 억제하여 내피-중간엽 전이(endothelial-mesenchymal transition; EMT)를 억제하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 엑소좀은 미토콘드리아 기능을 조절하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 엑소좀은 자가포식을 억제하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한, 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC)의 재생을 촉진하는 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 지방유래 중간엽줄기세포(Adipose-derived mesenchymal stem cells; ASC) 유래 엑소좀을 포함하는, 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환의 치료 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀은 각막내피세포 질환의 치료 또는 예방 효과가 있다.

[0019] 본 발명의 지방유래 중간엽줄기세포 유래 엑소좀은 각막내피세포의 재생을 촉진하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은, ASC 유래 엑소좀의 세포 흡수 및 세포 증식을 확인한 것으로, (A)에서 배양된 CEC에서 DiO 표지된 엑소좀은 녹색으로 표시되었고, (B)는 세포 생존력, (C)-(F)는 세포 주기를 분석한 도이다.

도 2는, ASC 유래 엑소좀의 TGF-β 또는 H_2O_2에 의한 노화에 대한 효과를 확인한 도이다.

도 3은, ASC 유래 엑소좀의 TGF-β 또는 H_2O_2에 의한 내피-중간엽 전이에 대한 효과를 확인한 도이다.

도 4는, ASC 유래 엑소좀의 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 미토파지에 대한 효과를 확인한 도이다.

도 5는, ASC 유래 엑소좀의 냉동손상된 쥐의 각막 내피에 미치는 재생 효과를 확인한 도이다.

도 6은, 냉동손상 후 ASC 유래 엑소좀의 쥐의 각막 내피를 보호하는 효과를 확인한 도이다.

도 7은, ASC 유래 엑소좀과 hCEC 유래 엑소좀 간에 차등적으로 발현된 miRNA를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 명세서에서, "엑소좀(exosome)"이란, 대부분의 진핵 세포의 엔도솜 구획에서 생성되는 막으로 둘러싸여 세포 외로 생성되는 모든 종류의 세포외 소포 (extracullarlar vesicles, EVs)를 의미한다.

[0022] 본 명세서에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 각막내피세포(corneal endothelial cells; hCEC) 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0023] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 각막내피세포 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다

[0024] 본 명세서에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품의 섭취에 의해 각막내피세포 질환, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 각막내피세포 질환의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0026] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하나, 본 발명이 이하의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1: ASC 유래 엑소좀의 각막내피세포 질환 치료 및 예방 또는 각막내피세포 재생 효과 확인**

[0029] **1. 실험방법**

[0030] **(1) 인간 각막내피세포(hCECs) 배양**

[0031] 이 연구는 헬싱키 선언에 따라 수행되었으며 한림대학교 의료원의 기관 심사 위원회/윤리 위원회(NON2022-004)의 검토 및 승인을 받았다. 세포는 이전에 알려진 방법에 따라 배양되었다. 3명의 기증자의 각막이 사용되었다. 인간 CEC-데스멘트 막 복합체를 0.25% 트립신/0.02% 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) 용액에서 10분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 세포를 피브로넥틴-콜라겐 조합(fibronectin-collagen combination; FNC) 코팅 믹스(Athena Environmental Sciences, Inc., Baltimore, MD, USA)로 코팅된 6웰 플레이트에 플레이팅했다. 세포를 confluency가 될 때까지 10-14일 동안 배양한 다음 0.25% 트립신/0.02% EDTA 용액을 사용하여 1:3의 비율로 계대했다.

[0032] **(2) 배지에서 엑소좀 분리 및 라벨링**

[0033] ASC 유래 엑소좀은 Biosolution Co. Ltd.(Seoul, Korea)로부터 입수하였다. DiO로 표지하기 위해, 정제된 엑소좀을 DiO 녹색 형광 막 염료(Invitrogen)와 함께 실온에서 1시간 동안 2μg/mL의 최종 농도로 인큐베이션했다. 제공된 컬럼을 사용하여 샘플을 추가로 정제하고 엑소좀을 200 μL의 PBS에서 용리했다. 엑소좀은 사용할 때까지 -80℃ 냉동고에 보관했다. 현미경 분석을 위해 커버 유리에서 성장한 세포를 37℃에서 6시간 동안 Opti-MEM에서 DiO 표지된 엑소좀과 함께 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 세척하여 결합되지 않은 표지된 엑소좀을 제거하고, 이어서 형광 현미경(DMi8, Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 이미지화하였다.

[0034] **(3) ASC 유래 엑소좀으로 hCEC 처리**

[0035] 웰당 4×10^4 개의 세포로 24웰 배양 플레이트에 hCEC를 시딩하고 5% CO_2 하에서 37℃의 성장 배지에서 24시간

동안 배양했다. 이어서 세포를 PBS로 세척하고 ASC 유래 엑소좀(각각 1 x 10^8, 2 x 10^8 입자/mL)이 있거나 없는 재조합 인간 TGF-β1(10ng/mL; ab50036, Abcam) 또는 H_2O_2로 48시간 동안 처리했다.

[0036] **(4) 세포 생존율 및 LDH 세포 독성 분석**

[0037] 세포(1 × 10^4)를 96웰 플레이트에서 배양하고 ASC 유래 엑소좀으로 48-72시간 동안 처리했다. 세포 생존율은 수용성 monosodium tetrazolium salt, WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)에 기초한 셀 카운팅 키트-(CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Jpan)을 이용하여 측정했다. 플레이트를 1-2시간 동안 CCK-8 용액과 함께 인큐베이션했다. 세포 생존율은 마이크로플레이트 분광광도계(Synergy HTX)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, 대조군(100%)의 백분율로서 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 실험은 3회 반복하였으며 대표적인 실험을 나타내었다.

[0038] LDH 세포 독성 분석은 제조업체의 지침에 따라 상업용 키트(MK401; Takara Bio, Otsu, Japan)를 사용하여 수행되었다. 세포(1 x 10^4 cells/well)를 96웰 플레이트에 넣고 5% CO_2를 포함하는 가습된 대기에서 48시간 동안 배양했다. 상층액을 새로운 96웰 플레이트로 옮기고 반응 기질과 혼합하고 37℃에서 30분 동안 배양했다. 마이크로플레이트 리더(Synergy HTX)를 사용하여 490 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 세포독성은 상응하는 블랭크를 뺀 후 대조군의 배수 변화로 표현하였다.

[0039] **(5) 세포주기 분석**

[0040] 세포 주기 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 요오드화 프로피듐(PI) 염색과 함께 Cytoflex 유세포 분석기(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 세포를 트립신 처리를 사용하여 수확하고, 차가운 PBS로 세척하고, 차가운 70% 에탄올로 고정하였다. 샘플은 -20℃에서 보관되었다. 세포를 50μg/ml PI 및 100μg/mL RNase A로 처리했다.

[0041] **(6) 면역형광 염색**

[0042] hCEC를 12웰 플레이트의 덮개 유리에서 배양하고 PBS로 세척하고 4% 파라포름알데히드 용액에서 20분 동안 고정했다. 세포를 0.5% Triton X-100으로 10분 동안 투과화하고 실온에서 1% 소 혈청 알부민(BSA)으로 1시간 동안 차단했다. 세척 후, 세포를 마우스 항-마우스 Ki67(sc-23900; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 또는 염소 항염소 네스틴 항체(sc-21248; Santa Cruz Biotechnology)와 함께 4℃에서 밤새 배양하고, PBS로 세척하였다. 세포를 플루오레세인 이소티오시아네이트-결합 염소 항-토끼 IgG 항체 또는 토끼 항-염소 항체(1:100)와 함께 어둠 속에서 37℃에서 1시간 동안 배양한 다음 Hoechst 33342 핵 염색 염료(1: 2000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 대비염색하였다. PBS로 광범위하게 세척한 후 슬라이드를 한 방울의 장착 배지로 장착하여 광표백을 줄였다. 음성 대조군 염색은 일차 항체를 생략하고 병행하여 수행하였다. 슬라이드는 형광 현미경(DMi8; Leica)으로 관찰되었다.

[0043] **(7) 미토콘드리아 산화 스트레스 평가**

[0044] MitoSOXTM Red(Invitrogen)를 사용하여 미토콘드리아 과산화물 생성을 측정했다. 세포를 어둠 속에서 37℃에서 10분 동안 5μM MitoSOXTM 시약과 함께 인큐베이션했다. 각 웰의 형광 강도는 Cytoflex 유세포 분석기(Beckman-Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 측정되었다.

[0045] **(8) 노화(senescence) 관련 β-갈락토시다아제 분석**

[0046] 노화 관련 β-갈락토시다아제(SA-β-gal) 염색은 SA-β-gal 염색 키트(Biovision)를 사용하여 수행되었다. 간단히, 세포로부터 성장 배지를 제거한 후, 세포를 PBS로 1회 헹구었다. 고정 용액을 각 웰에 첨가하고 세포를 25℃에서 10-15분 동안 고정했다. PBS로 세포를 세척한 후, 세포를 건조 배양기에서 밤새 37℃의 β-갈락토시다아제 염색 용액에서 배양하였다.

[0047] **(9) 미토콘드리아 막 전위 분석**

[0048] JC-1은 미토콘드리아 막 전위의 이미지를 얻는 데 사용되었다. 미토콘드리아 막 전위의 변화를 감지하기 위해 MitoPotential 염료를 사용하는 Muse™ MitoPotential assay(Merck Millipore, Guyancourt, France)를 사용했다. 데이터는 Cytoflex 유세포 분석기(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 분석되었다.

[0049] **(10) 자가포식소체 염색**

[0050] 세포를 덮개 유리 바닥 접시에 파종하고 CYTO-ID® Autophagy 검출 키트(Enzo Life Science, NY, USA)로 30분 동안 염색한 다음 PBS로 세척했다. 세포를 형광현미경(DMi8; Leica)으로 관찰하였다.

[0051] **(11) 웨스턴 블롯**

[0052] 프로테아제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)와 포스파타제(PhosSTOP; Roche, Basel, Switzerland) 억제제 칵테일을 포함하는 Radioimmunoprecipitation assay buffer(Biosesang, Seoul, Korea)를 사용하여 총 세포 단백질을 분리했다. 표준 프로토콜을 사용하여 웨스턴 블로팅을 수행했다. 5% 탈지유 또는 젤라틴을 사용하여 1시간 동안 비특이적 결합을 차단했다. 1차 항체는 다음과 같았다: 마우스 항-인간 N-카드헤린 항체(sc-59987, Santa Cruz, 1:500 희석); 마우스 항-인간 YAP 항체(sc-376830, 1:500 희석); 토끼 항-포스포-YAP 항체(PA5-17481, Invitrogen, 1:500 희석); 마우스 항-LC3 항체(M186-3, MBL, 1:1000 희석); 또는 토끼 항 GAPDH 항체(LF-PA0212, Abfrontier, 1:5000 희석). HRP(horseradish peroxidase) 결합 2차 항체와 WEST-Queen™ western blot detection kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 면역반응 밴드를 검출하였다. 데이터는 비디오 이미지 분석(Luminograph II, Atto, Tokyo, Japan)을 사용하여 정량화되었다. 단백질 밴드는 농도계를 사용하여 측정되었다.

[0053] **(12) 동물 연구**

[0054] 이 연구는 한림대학교 의료원의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았다(2021-3-0610-30). 모든 절차는 시력 및 안과 연구 협회(ARVO) 안과 및 시력 연구에서 동물 사용에 대한 성명서에 따라 수행되었다. 6주령 암컷 Sprague-Dawley(SD) 쥐(Raonbio, Yongin, Korea)가 이 절차에 사용되었으며 각 그룹에 6마리의 SD 쥐가 포함되었다.

[0055] **(13) 엑소좀을 사용한 쥐 CEC의 생체 내 치료**

[0056] ASC 유래 엑소좀(4.5×10^8/10 μl)을 SD 쥐의 전방에 주입하고, 7 mm 직경의 핀셋 전극(BTX Harvard Apparatus, San Diego, CA, USA)을 양쪽 각막에 놓고 전기천공은 ECM830 시스템(BTX Harvard Apparatus)을 사용하여 수행하였다. 전기천공에 대한 매개변수는 다음과 같다: 5회, 950ms 간격으로 100V에서 100ms 지속 시간.

[0057] **(14) 임상 평가**

[0058] 각막 혼탁은 2, 4, 7, 10 및 14일에 얻은 사진을 사용하여 평가되었다. 각막 혼탁은 다음과 같이 등급이 매겨졌다: 등급 0, 불투명도 없음; 1등급, 눈에 보이는 홍채 디테일이 있는 약간의 불투명도; 2등급, 홍채의 부분적 마스킹이 있는 중간 정도의 불투명도; 및 등급 3, 홍채 세부 사항을 볼 수 없는 심각한 불투명도.

[0059] **(15) 알리자린 S 레드 염색**

[0060] 바이탈 염색은 0.9% NaCl(pH 4.2)에 녹인 0.2% Alizarin Red S로 90초 동안 수행하였고, 각막은 2.5% glutaraldehyde로 고정하였다. 각막 단추를 제거하고 슬라이드 위에 놓고 0.9% NaCl 한 방울과 함께 커버슬립 아래에 장착했다. 광학현미경(DMi8; Leica)으로 각막내피를 관찰하였다. 세포 밀도를 계산했다.

[0061] **(16) MicroRNA 분리 및 시퀀싱**

[0062] 차세대 시퀀싱(NGS) 분석을 위한 모든 절차는 마크로젠(서울, 한국)에서 수행했다. Exo2D-for RNA(EP-RU10, Exosomeplus, Seoul, Korea)를 사용하여 hCEC의 조건 배지에서 엑소좀 추출 후 miRNeasy Serum/Plasma Kit(217184, Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 엑소좀 miRNA를 추출했다.

[0063] 샘플을 처리하여 각 라이브러리에 대한 입력으로 엑소좀 RNA(10ng)를 생성했다. 제조업체의 지침에 따라 SMARTer smRNA-Seq Kit for Illumina®(Takara Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 소형 RNA 라이브러리를 구성했다. 폴리아데닐화, cDNA 합성 및 PCR 증폭을 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 구성했다. cDNA 단편은 Illumina 플랫폼에서 sequence-by-synthesis 방법을 사용하여 리드 길이로 시퀀싱되었다.

[0064] **(17) miRNA 발현 수준 분석**

[0065] 시퀀싱 후 로우 시퀀스 리드는 품질에 따라 필터링되었다. 어댑터 시퀀스는 로우 시퀀스 리드에서 트리밍되었다. rRNA가 제거된 리드는 참조 게놈인 miRBase v22.1과 non-coding RNA 데이터베이스인 RNAcentral 14.0에 순차적으로 정렬되어 알려진 miRNA 및 tRNA, snRNA 및 snoRNA와 같은 다른 유형의 RNA를 분류한다. 새로운 miRNA 예측은 miRDeep2를 사용하여 수행되었다. 로우 데이터는 edgeR에서 M-값의 잘린 평균(trimmed mean

of the M-values; TMM)을 사용하여 정규화되었다. log2 변환을 촉진하고 상관 관계 플롯을 그리기 위해 필터링된 miRNA의 정규화된 리드 수에 하나를 추가했다. 각 miRNA에 대해 logCPM 및 log 배수 변화가 그룹 간에 계산되었다. EdgeR의 exactTest 함수를 사용하여 두 그룹을 비교하기 위해 통계적 가설 테스트를 수행했다. 두 그룹 간에 차등적으로 발현되는 miRNA는 |fold change| ≥2 및 로우 p-값 < 0.05으로 정의되었다. 또한 |fold change| ≥2 및 로우 p-값 < 0.05의 기준을 만족하는 차등적으로 발현되는 miRNA의 발현 패턴을 나타내기 위해 완전 연결 및 유클리드 거리를 유사성의 척도로 사용하여 계층적 클러스터링 분석을 수행하였다. 차등적으로 발현된 유전자의 모든 데이터 분석 및 시각화는 R 3.6.2 프로그램(R Foundation, Vienna, Austria)을 사용하여 수행되었다.

[0066] **(18) miRNA 표적 예측 및 DE miRNA 기능 분석**

[0067] 12개의 조절되지 않는 miRNA의 생물학적 역할을 조사하기 위해 Targetbase(v7.0) 또는 microT-CDS(v5.0) 및 DIANA 도구 소프트웨어를 사용하여 잠재적인 표적 유전자를 예측했다. DE miRNA 표적 유전자(MTG) 및 조절 장애 유전자의 경로 및 기능적 주석을 포함한 농축 분석은 ShinyGo 및 DIANA-mirPath v.3.0 웹 서버를 사용하여 수행되었다. 조절되지 않는 miRNA의 잠재적인 기능 메커니즘을 조사하기 위해 DIANA-mirPath v.3.0 웹 서버를 사용하여 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로 분석을 사용했으며 FDR 컷오프는 p = 0.05이다.

[0068] **(19) 통계 방법**

[0069] 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시된다. 독립 t-검정과 일원 및 이원 ANOVA가 사용되었다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 9.3.1 소프트웨어(San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 통계적 유의성은 P < 0.05로 설정되었다.

[0070] **2. 실험 결과**

[0071] **(1) ASC 유래 엑소좀의 세포 흡수 및 세포 증식을 확인함**

[0072] 초기에 엑소좀의 흡수를 조사하기 위해 ASC 유래 엑소좀을 DiO로 염색하여 시각화하고 환원된 혈청 배지인 Opti-MEM I을 사용하여 전달했다. 형질감염된 DiO 표지된 엑소좀은 형광 현미경을 사용하여 hCEC에서 녹색 형광으로 시각화되었다(도 1의 A). ASC 유래 엑소좀이 세포 생존율이나 증식에 영향을 미치는지 알아보기 위해 CCK-8 분석 및 세포 주기 분석을 수행했다. 세포 생존력 및 세포 주기 분석은 ASC 유래 엑소좀이 hCEC의 증식 및 G0/G1 단계에서 S 단계인 DNA 복제 단계로의 세포 주기 변화를 유도함을 나타냈다(도 1의 B-F).

[0074] **(2) ASC 유래 엑소좀은 TGF-β 유도 노화 또는 H_2O_2 유도 노화로부터 hCEC를 보호함**

[0075] ASC 유래 엑소좀이 유전독성 스트레스 하에서 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 TGF-β 또는 H_2O_2를 사용하여 노화를 촉진하고 CCK-8 세포 생존율 및 LDH 세포독성을 수행하였다. TGF-β 및 H_2O_2는 세포 생존력을 감소시키고, ASC 유래 엑소좀에 의해 완화된 세포독성을 증가시켰다(도 2의 A 및 B). MitoSOX 프로브를 사용하여 미토콘드리아 산화 스트레스 수준을 평가하고 SA-β-gal 염색을 사용하여 노화를 평가했다(도 2의 C-F). 미토콘드리아 산화 스트레스 수준과 SA-β-gal-양성 세포의 수는 TGF-β 또는 H_2O_2에 노출된 후 증가하여, 노화 및 관련 반응을 나타낸다. ASC 유래 엑소좀은 hCEC에서 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 노화를 완화시켰다.

[0076] **(3) ASC 유래 엑소좀은 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 내피-중간엽 전이로부터 hCEC를 보호함**

[0077] 내피-중간엽 전이(endothelial-mesenchymal transition; EMT)에 대한 ASC 유래 엑소좀의 효과를 조사하기 위해 N-카드헤린 수준을 평가했다. TGF-β 또는 H_2O_2는 EMT 마커로 간주되는 N-카드헤린 수준을 상향 조절했으며, ASC 유래 엑소좀은 이 효과를 완화했다(도 3의 A 및 B). EMT를 담당하고 pYAP와 YAP로 구성된 Hippo 신호 전달 경로를 평가했다. pYAP는 ASC 유래 엑소좀에 의해 상향 조절되었으며(도 3의 C 및 D), 이는 Hippo 신호 전달 경로의 활성화를 나타낸다. 또한, TGF-β 또는 H_2O_2에 노출된 후 엑소좀 처리된 세포에서 핵에 YAP가 있는 세포의 수가 YAP의 핵 전위를 유도함에도 불구하고 더 낮았다(도 3의 F). ASC 유래 엑소좀에 의한 EMT 억제가 증식을 촉진하는지 여부를 조사하기 위해 증식 마커인 Ki67의 면역형광 염색을 수행하였다. Ki67 양성 세포의 비율은 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 EMT에 대한 ASC 유래 엑소좀에 의해 증가했다(도 3의 G 및 H).

[0078] **(4) ASC 유래 엑소좀은 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 미토파지로부터 hCEC를 보호함**

[0079] ASC 유래 엑소좀이 세포 사멸에 미치는 영향을 평가하기 위해 미토콘드리아 막 전위와 자가포식(autophagy)을 평가했다. 미토콘드리아 막 전위는 JC-1을 사용하여 시각화되었고 Muse MitoPotential 키트 및 유세포 분석을 사용하여 평가되었다(도 4의 A-C). TGF-β 또는 H_2O_2는 미토콘드리아 막 전위를 감소시켰고, 이 효과는 ASC 유래 엑소좀에 의해 완화되었다. 자가포식 검출 키트와 LC3의 western blotting을 사용하여 자가포식을 조사했다. TGF-β와 H_2O_2는 자가소화포 및 자가포식 동안 발생하는 LC3I에서 LC3II로의 전환을 유의하게 촉진한다. ASC 유래 엑소좀은 TGF-β 또는 H_2O_2 유도 자가포식 반응을 약화시킨다.

[0080] **(5) 쥐의 각막 내피는 생체 내 상처 치유를 촉진하는 ASC 유래 엑소좀을 흡수함**

[0081] ASC 유래 엑소좀의 효과를 확인하기 위해 동물 실험을 진행하였다. 우선, ASC 유래 엑소좀이 전기천공법에 의해 쥐의 각막 내피에 들어갈 수 있는지 여부를 확인했다. 세포막을 염색하는 DiO로 염색된 엑소좀은 엑소좀 주입군의 각막 내피에서 녹색 형광을 나타냈다(도 5의 A). 액체질소를 이용한 냉동손상(cryoinjury) 후 각막은 각막내피 손상으로 인해 불투명해졌다. 각막 혼탁은 엑소좀 주입군에서 더 빨리 감소했다(도 5의 B 및 C). 알리자린 S 레드 염색을 사용하여 평가한 각막 내피 밀도는 엑소좀 주입군에서 증가했다(도 5의 D 및 E). 각막 내피 재생을 확인하기 위해 증식 마커인 Ki67에 대한 면역 형광 염색을 수행했다. Ki67-양성 세포는 비처리군에 비해 엑소좀 주입군에서 더 빈번하였다(도 5의 F 및 G). 줄기세포 활성을 조사하기 위해 신경 상피 줄기세포 단백질인 네스틴에 대한 면역 형광 염색을 수행했다. 네스틴 양성 세포는 처리되지 않은 군에 비해 엑소좀 주입군에서 숫자가 더 높았다(도 5의 H 및 I).

[0082] **(6) ASC 유래 엑소좀은 냉동손상(cryoinjury)으로 인한 각막 내피 손상으로부터 각막 내피를 보호함**

[0083] 생체 내 미토콘드리아 막 전위를 조사하기 위해 JC-1을 사용하여 SD 쥐의 각막 내피에서 미토콘드리아를 염색했다. 건강하고 극성화된 미토콘드리아를 나타내는 적색 형광 강도는 대조군보다 엑소좀 그룹에서 더 높았다(도 6의 A). MitoSOX red 프로브는 SD 쥐의 각막 내피에서 미토콘드리아 산화 스트레스 수준을 평가하는 데 사용되었다. 쥐 각막 내피의 MitoSOX 적색 강도는 대조군보다 엑소좀 그룹에서 더 낮았으며, 이는 엑소좀 그룹에서 더 낮은 산화 스트레스를 나타낸다(도 6의 B).

[0084] **(7) ASC 유래 엑소좀의 마이크로RNA**

[0085] ASC 유래 엑소좀과 hCEC 유래 엑소좀 간의 miRNA의 차이를 조사했다. 볼케이노 플롯은 ASC 유래 엑소좀과 hCEC 유래 엑소좀 간의 miRNA 발현 수준의 차이를 나타낸다(도 7의 A). ASC 유래 엑소좀과 Hcec 유래 엑소좀 간의 miRNA 히트맵은 도 7의 B에 나타낸다. ASC 유래 엑소좀은 hCEC 유래 엑소좀에 비해, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-4301, hsa-miR-489-3p, hsa-miR-1538, hsa-miR-6126, hsa-miR-762, hsa-miR-1246, hsa-miR-1228-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-4647, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-6511b-3p, hsa-miR-8485, hsa-miR-1306-5p 및 hsa-miR-1290의 발현량이 더 높고(표 1), 그리고 hsa-miR-423-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-34a-5p , hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-7i-5p, hsa-miR-7e-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7d-5p 및 hsa-miR-7b-5p의 발현량은 낮다(표 1).

표 1

miRNA	FDR	Log_2FC	Regulation
hsa-let-7i-5p	2.1727E-07	-194.897901	Down
hsa-miR-221-3p	4.3158E-06	-71.184344	Down
hsa-miR-29a-3p	2.1916E-06	-58.921689	Down
hsa-miR-24-3p	1.1229E-05	-55.782975	Down
hsa-miR-130a-3p	0.00017438	-44.609079	Down
hsa-miR-149-5p	0.00035217	-38.343655	Down
hsa-miR-186-5p	0.00037198	-37.367225	Down
hsa-let-7d-5p	0.00015943	-28.352306	Down
hsa-let-7f-5p	7.3161E-05	-22.390628	Down
hsa-let-7g-5p	0.00054502	-15.245191	Down
hsa-let-7a-5p	0.00021477	-15.017823	Down
hsa-miR-423-3p	0.02493622	-14.095648	Down
hsa-miR-222-3p	0.00137105	-13.518604	Down
hsa-miR-21-5p	0.00178572	-12.336949	Down
hsa-miR-191-5p	0.00196918	-10.959173	Down
hsa-miR-23b-3p	0.00159189	-10.825331	Down
hsa-miR-25-3p	0.00396424	-9.888494	Down
hsa-let-7e-5p	0.00451741	-8.744121	Down
hsa-miR-143-3p	0.098648082	-7.830223	Down
hsa-miR-29b-3p	0.01532825	-7.280391	Down
hsa-let-7a-3p	0.052913094	-7.155717	Down
hsa-miR-199a-5p	0.01486005	-6.852863	Down
hsa-miR-199a-3p	0.02793724	-6.450906	Down
hsa-miR-199b-3p	0.02793724	-6.450906	Down
hsa-miR-23a-3p	0.02751576	-5.096368	Down
hsa-miR-34a-5p	0.058889291	-5.026538	Down
hsa-miR-125b-5p	0.02940564	-4.888319	Down
hsa-miR-574-3p	0.03235707	-4.732195	Down
hsa-let-7b-5p	0.03235707	-4.622342	Down

[0086]

hsa-miR-125a-5p	0.058889291	-4.056346	Down
hsa-miR-193b-5p	0.052913094	4.700097	Up
hsa-miR-1306-5p	0.052913094	7.906345	Up
hsa-miR-23a-5p	0.058889291	8.370368	Up
hsa-miR-619-5p	0.00883593	11.831495	Up
hsa-miR-762	0.052913094	15.001013	Up
hsa-miR-6511b-3p	0.099515986	16.319879	Up
hsa-miR-6126	0.00011642	17.918932	Up
hsa-miR-1538	0.052913094	21.725345	Up
hsa-miR-409-3p	0.052913094	21.725345	Up
hsa-miR-486-3p	0.02793724	27.130810	Up
hsa-miR-4301	0.00016199	27.937320	Up
hsa-miR-1246	4.913E-06	35.320756	Up
hsa-miR-1228-5p	0.052913094	39.375945	Up
hsa-miR-4647	0.052913094	39.375945	Up
hsa-miR-1290	2.1916E-06	46.983113	Up
hsa-miR-8485	2.3535E-08	172.464431	Up
hsa-miR-196a-5p	7.9199E-06	274.506271	Up

[0087]

[0088] miRbase 및 miRDB를 사용하여 기능을 추가로 탐색하기 위해 차등적으로 발현된 miRNA의 잠재적인 표적 유전자를 예측했다. KEGG 경로 분석에서 중요한 기능과 신호 경로는 miRpath v.3.0을 사용하여 분석되었다. ASC 유래 엑소좀에서 과발현된 miRNA의 경로 분석 결과 라이신 분해, 부착 접합부, TGF-β 신호 전달 경로, p53 신호 전달 경로, Hippo 신호 전달 경로, 비소세포 폐암, FoxO 신호 전달 경로, 액틴 세포골격 조절 및 RNA 분해가 나타났다(표 2).

표 2

Pathway	miRNAs	p-value
Lysine degradation	hsa-miR-486-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1290, hsa-miR-1306-5p	3.11e-09
Adherens junction	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-23a-5p	1.19e-05
TGF-beta signaling pathway	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, hsa-miR-1306-5p	0.0020
p53 signaling pathway	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-1246, hsa-miR-1290, miR-1306-5p	0.0151
Hippo signaling pathway	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-1290	0.0012
FoxO signaling pathway	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-1290	0.0015
Regulation of actin cytoskeleton	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-1228-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-1290	0.0158
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-1246, hsa-miR-1228-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-1290	0.0264

[0089]

[0090] ASC 유래 엑소좀에서 저발현된 miRNA의 경로 분석은 라이신 분해, 세포 주기, 부착 접합부, Hippo 신호 전달 경로, p53 신호 전달 경로, TGF-β 신호 전달 경로, 액틴 세포골격 조절, Wnt 신호 전달 경로, FoxO 신호 전달 경로, MAPK 신호 전달 경로, 리소좀, DNA 복제 및 세포자멸사를 나타냈다(표 3).

표 3

Pathway	miRNAs	p-value
Lysine degradation	hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p	8.14E-8
Cell cycle	hsa-miR-25-3p, hsa-let-7f-5p hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-23b-3p hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-199b-3p	7.17E-10
Adherens junction	hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-24-3p hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-423-3p	1.33E-09
Hippo signaling pathway	hsa-let-7e-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-23b-3p hsa-miR-186-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-199b-3p	1.08E-07
p53 signaling pathway	hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-125a-5p hsa-miR-125b-5p hsa-miR-222-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7a-5p hsa-let-7a-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-191-5p hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-199a-5p	1.07E-06
TGF-beta signaling pathway	hsa-miR-222-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7d-5p,	2.05E-07

[0091]

	hsa-let-7b-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-423-3p	
Regulation of actin cytoskeleton	hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-199a-3p hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-143-3p	0.0056
Wnt signaling pathway	hsa-miR-23b-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-199b-3p	0.0110
FoxO signaling pathway	hsa-miR-25-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-191-5p	0.0001
MAPK signaling pathway	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7a-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-199b-3p,	0.0149
DNA replication	hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p	0.0353
Apoptosis	hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-	0.0149

[0092]

	miR-25-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-143-3p

[0093]

[0094] **3. 결론**

[0095] MSC 유래 엑소좀은 여러 장기의 재생에 효과적인 것으로 알려져 있다. MSC 중 ASC는 조직 재생 및 염증 조절에 용이하고 안전하며 효과적이다. ASC와 비교하여 ASC 유래 엑소좀은 더 작은 크기, 더 나은 조직 침투, 비세포성 반응, 쉬운 저장, 낮은 면역원성, 비세포독성 및 비돌연변이성 특성을 포함하는 몇 가지 장점이 있다. 본 발명에서는 ASC 유래 엑소좀이 각막 내피 재생에 미치는 영향과 작용 기전을 조사하였다.

[0096] 본 발명자들은 먼저 ASC 유래 엑소좀이 시험관내 및 생체내 모두에서 CEC를 재생한다는 것을 입증했다. 냉동손

상은 직접 손상 및 2차 염증 반응을 통해 CEC 질병 모델을 생성하기 위해 CEC를 파괴하는 데 사용되었다. ASC 유래 엑소좀은 네스틴 염색 줄기세포의 활성화를 통해 CEC 증식을 활성화하고, 이러한 CEC 재생은 쥐 각막의 투명도를 향상시킨다. ASC 유래 엑소좀은 세포 유형별 단백질 조합(세포골격 단백질, 막횡단 단백질, 열충격 단백질), 핵산(DNA, mRNA, miRNA, long 및 short non-coding RNA), 지질 및 효소(GAPDH, ATPase 및 pgk1)으로 구성되어 있어 다양한 생물학적 활성을 가지고 있으며, 복잡한 세포 간 통신 시스템에 관여하는 서로 다른 세포 간에 이러한 활성 화물을 이동시킨다. ASC 유래 엑소좀의 MiRNA에는 let-7a-5p, miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-302-3p 및 miR-1246을 포함하고, 이들은 다능성을 조절하고 EMT를 억제하며 상처 치유를 촉진한다. TSG-6과 IL-1, IL-10과 같은 사이토카인은 면역반응을 조절하고, FGF, HGF, PDGF와 같은 성장인자는 상처치유를 촉진한다. 이러한 인자들은 각막내피세포에 대해 재생 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

[0097] 본 발명자들은 각막 내피 재생을 위한 메커니즘으로서 내피-중간엽 전이 (EMT)의 억제를 제안했다. 본 발명자들은 ASC 유래 엑소좀이 N-카드헤린 발현을 억제하여 EMT를 억제한다는 것을 보여주었다. TGF-β와 산화 스트레스는 EMT를 유도하여 조직 재생을 억제하며, CEC 기능 장애를 유도하고 CEC에서 각막 혼탁을 유발하는 주요 기전이다. Hippo 신호는 EMT의 신호 전달 경로 중 하나이며, TEAD 의존적 방식으로 EMT를 유도하는 것으로 나타난 YAP와 TAZ로 구성된다. 핵의 YAP는 SNAI, CTGF, BIRC5 및 CYR61과 같은 EMT 유전자의 발현을 증가시킨다. YAP는 세포질에서 나와 pYAP로 인산화되고 유비퀴틴 특이적 펩티다제 9 X-연결(USP9X)에 의해 분해된다. 따라서 pYAP의 상향 조절은 EMT를 억제한다. 각막 내피 재생을 위한 또 다른 기전으로, 본 발명에서는 ASC 유래 엑소좀이 ROS를 억제하여 노화를 억제한다는 것을 보여주었다. TGF-β와 산화 스트레스는 ROS를 증가시켜 노화를 유도하며, 이는 CEC에서 G0/G1 세포 주기 정지를 유도하고 세포 비대를 유도하여 CEC 재생을 억제하는 주요 메커니즘이다. ASC 유래 엑소좀은 노화를 하향 조절하고, p16INK4a 및 IL-6을 통해 노화 관련 분비 표현형 관련 활성을 약화시켰다.

[0098] 산화 스트레스와 미토콘드리아 기능은 노화에 중요하다. 본 발명자들은 ASC 유래 엑소좀이 시험관 내와 생체 내 모두에서 노화를 개선한다는 것을 보여주었다. 미토콘드리아 막 전위의 탈분극은 미토콘드리아 기능 장애를 나타내며 초기 세포 사멸에서도 관찰된다. 미토콘드리아는 CEC가 각막 기질을 탈수시키기 위해 많은 양의 에너지를 소비하기 때문에 CEC의 생존과 기능에 필수적인 역할을 한다. ASC 유래 엑소좀은 미토콘드리아 단백질, 지질 및 mtDNA를 세포 소기관으로 또는 그로부터 운반하여 미토콘드리아 무결성을 복원한다. 자가포식(autophagy)은 생체 분자를 재활용하여 세포 생존에 기여하지만 세포 증식 및 재생을 억제하는 일종의 세포 사멸이다. ASC 유래 엑소좀은 자가포식을 억제하여 CEC를 재생성할 수 있다. EMT는 미토콘드리아 기능 장애, ROS 수준 증가 및 미토콘드리아 막 전위 감소와 관련이 있다. 자가포식은 TGF-β 의존성 신호 전달을 통해 EMT를 촉진한다. 따라서 자가포식을 억제하면 EMT가 억제되고 미토콘드리아 기능이 회복된다.

[0099] 본 발명자들은 ASC 유래 엑소좀과 hCEC 유래 엑소좀 사이에 차등적으로 발현된 miRNA를 조사했다. 차등적으로 발현되는 miRNA와 관련된 경로는 표 2 및 3에 요약되어 있다. 이들은 라이신 분해, 증식, TGF-β 신호전달 경로, p53 신호전달 경로, Hippo 신호전달 경로, FoxO 신호전달 경로 및 액틴 세포골격 조절의 기능을 특징으로 한다. 라이신 분해는 미토콘드리아에서 발생하고 미토콘드리아 에너지 생산을 조절합니다. 이 연구에서 본 발명자들은 ASC 유래 엑소좀이 미토콘드리아 기능을 활성화한다는 것을 보여주었다. 또한, ASC 유래 엑소좀은 p53 신호전달 경로와 관련된 TGF-β 신호전달 경로, 히포 신호전달 경로 및 노화를 억제한다.

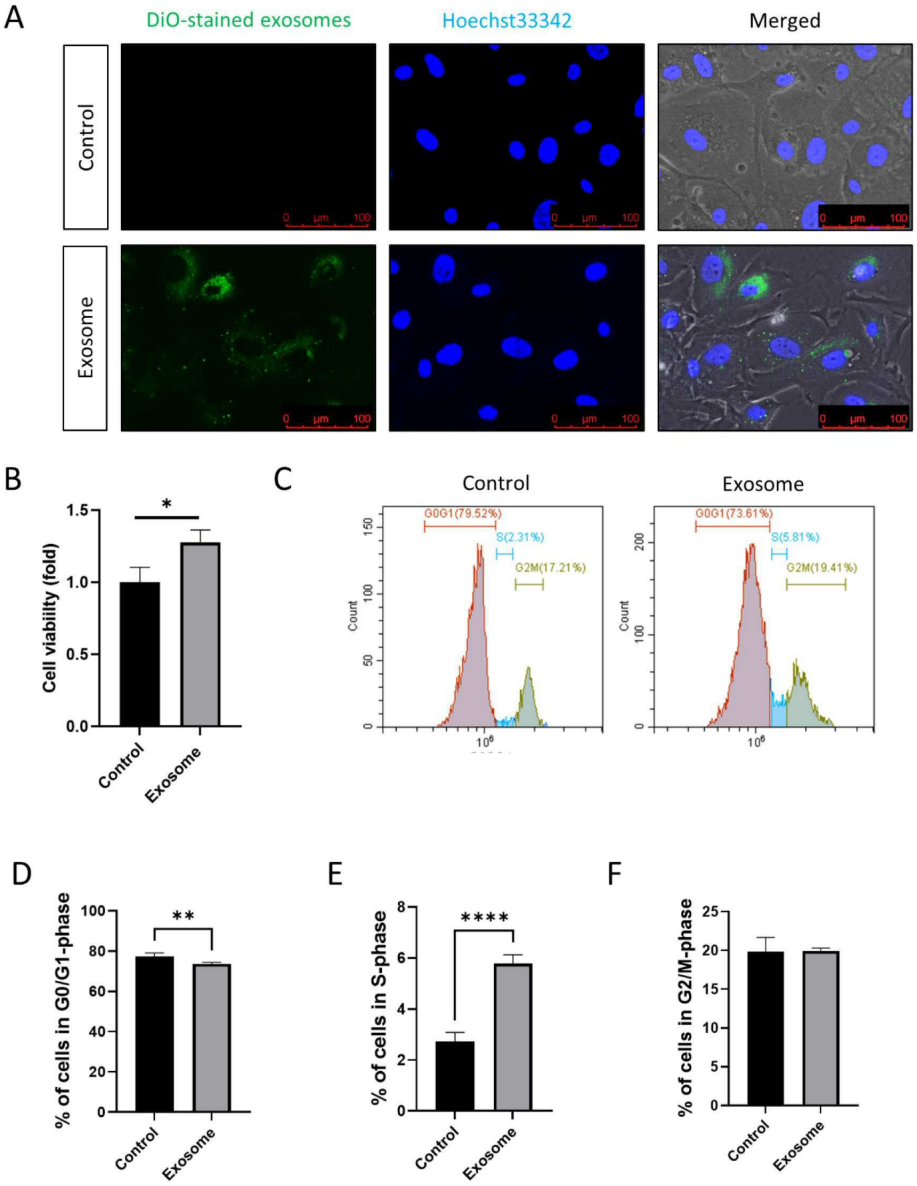
[0100] ASC 유래 엑소좀에서 과발현된 여러 miRNA의 기능은 이전에 설명되었다. miR-8485는 Wnt/β-catenin 경로를 활성화하고, 세포 증식과 이동을 촉진한다. miR-1298은 protein phosphatase 2를 표적으로 하여 심근 허혈 재관류 손상을 약화시키고, TGF-β2/Smad4 경로를 억제하고, 표준 Wnt 경로를 활성화하고, 자가포식을 억제하여 만성 산화 스트레스로 인한 손상으로부터 세포를 보호한다. miR-619-5p는 증식을 촉진하고 PTEN/AKT/p21 경로를 억제한다. miR-486-3p는 TGF-β/SMAD 경로에 의해 조절되며 항섬유화 효과를 발휘한다. miR-193b는 TGF-β1에 의해 하향 조절되고 TGF-β 수용체 유형 3을 표적으로 하여 TGF-β 신호를 조절한다. miR-1228은 세포 사멸을 방지하고 상피-중간엽 전이를 억제한다. miR-762는 주로 미토콘드리아로 이동하고 미토콘드리아 기능의 조절에 참여한다. miR-489-3p는 산화 스트레스 반응을 조절하고, Toll-like receptor 4/NF-κB 신호 전달을 억제하여 염증을 예방하고, TGF-β1에 의해 유도되는 섬유화 마커의 발현을 감소시킨다. miR-196a-5p는 SMAD4를 표적으로 하고 TGF-β 수용체 2를 표적으로 하여 신장 섬유증을 완화함으로써 위암 줄기세포 유사 특성을 조절한다. miR-1306-5p는 TGF-β 수용체 2를 표적으로 하고 전사 인자 SMAD4를 억제한다. miR-1290은 레티노산 수용체 관련 고아 수용체 A(RORA)를 표적으로 하여 줄기를 조절한다.

[0101] 또한, hCEC 유래 엑소좀과 비교하여 ASC 유래 엑소좀에서 하향조절되는 miRNA가 설명되었다. hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-

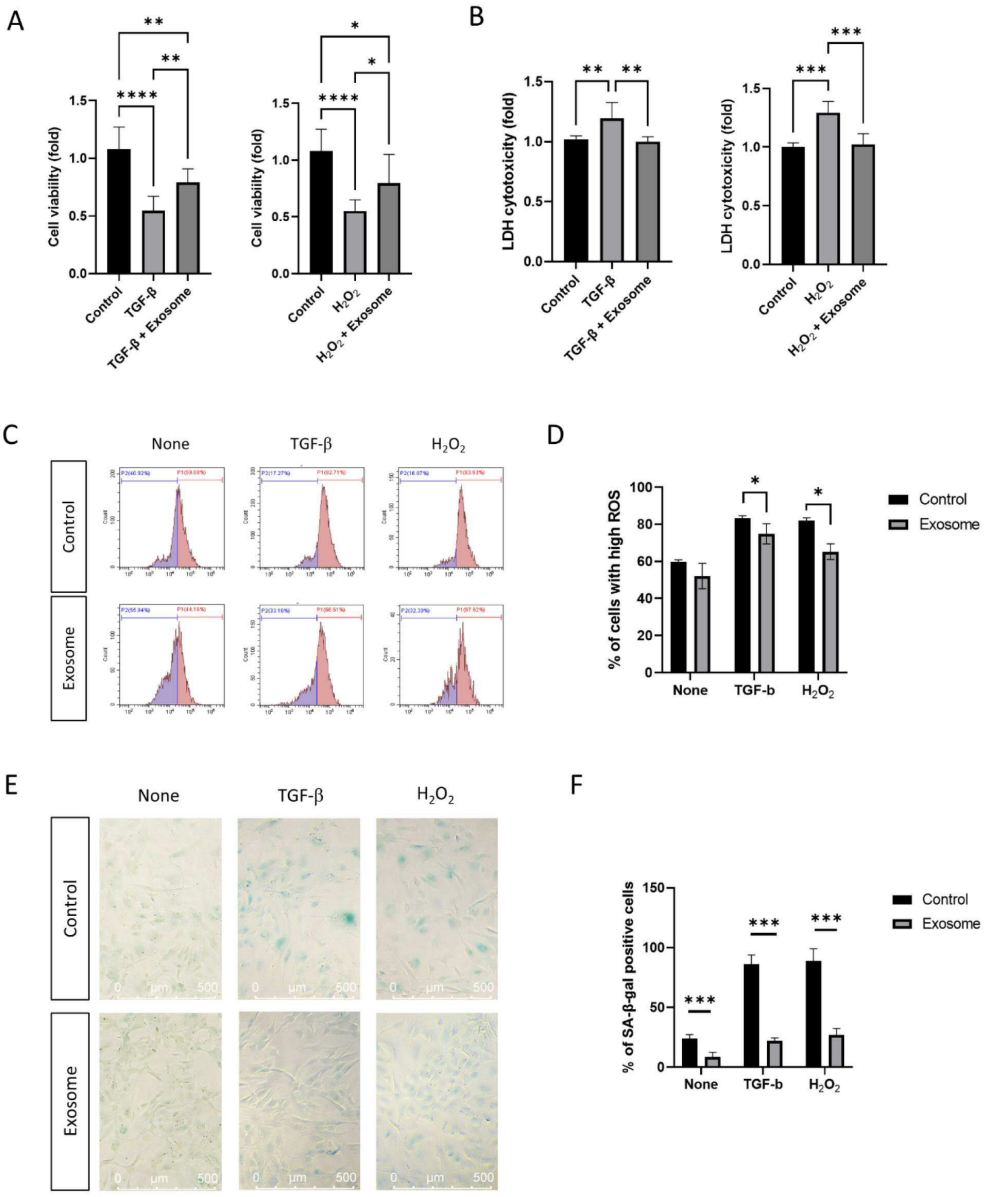
122-5p, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-574-3p 및 hsa-miR-574-5p를 포함하는 대부분이 노화 세포에서 상향 조절되는 것으로 보고되었다. miR-423-3p는 CYBRD1을 표적으로 하여 상피에서 중간엽으로의 전환을 유도한다. miR-222-3p는 E-cadherin 및 Notch 신호 전달을 표적으로 하여 상피에서 중간엽으로의 전환을 촉진한다. miR-25-3p는 NOX4를 상향 조절하여 산화 스트레스를 조절한다. miR-29는 다중 신호 경로를 통해 세포 노화를 유도하고, AMPK 경로를 조절하여 미립자 물질에 의한 염증 반응을 촉진한다. miR-143-3p는 ER 스트레스를 간접적으로 그리고 부정적으로 조절하는 TGF-β 유도성 miRNA이다. miR-130a-3p는 SMAD4를 통해 TGF-β가 유도하는 상피-중간엽 전이를 억제한다. miR-21은 TGF-β1 신호 전달 경로에 관여하고, Hippo 신호 전달 경로를 억제한다. miR-23b-3p는 SMAD2 인산화를 증가시켜 TGF-β 신호전달을 활성화하고, SIRT1을 억제하여 자가포식을 조절한다. miR-29, miR-143 및 miR-21은 미토파지를 억제한다. miR-221-3p는 상피에서 중간엽으로의 전이를 촉진하고 세포 이동을 촉진한다. miR-186-5p는 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도한다. miR-138a-3p는 EZH2를 표적으로 하여 신장세포암 세포에서 노화를 유도한다. 그리고 progerin-발현 내피 세포에서 두 개의 분리된 노화 조절 가지인 p53 및 p16 관련 경로를 강화한다. miR-199a-3p/5p는 DUSP5/MAP3K11을 표적으로 하여 TGF-β 및 EGF로 유도된 상피에서 중간엽으로의 전이에 참여한다. miR-191-5p는 저산소증에 의해 유도되어 TGF-β 신호 전달을 조절한다. miR-199b-3p는 ZEB1을 표적으로 하여 상피에서 중간엽으로의 전이(EMT) 신호 전달 경로를 통해 난소암의 성장과 진행을 억제한다. miR-574-3p는 TGF-β1에 의해 유도되어 세포 사멸을 유도한다. miR-24-3p는 Hippo 신호 전달 경로를 비활성화한다.

도면

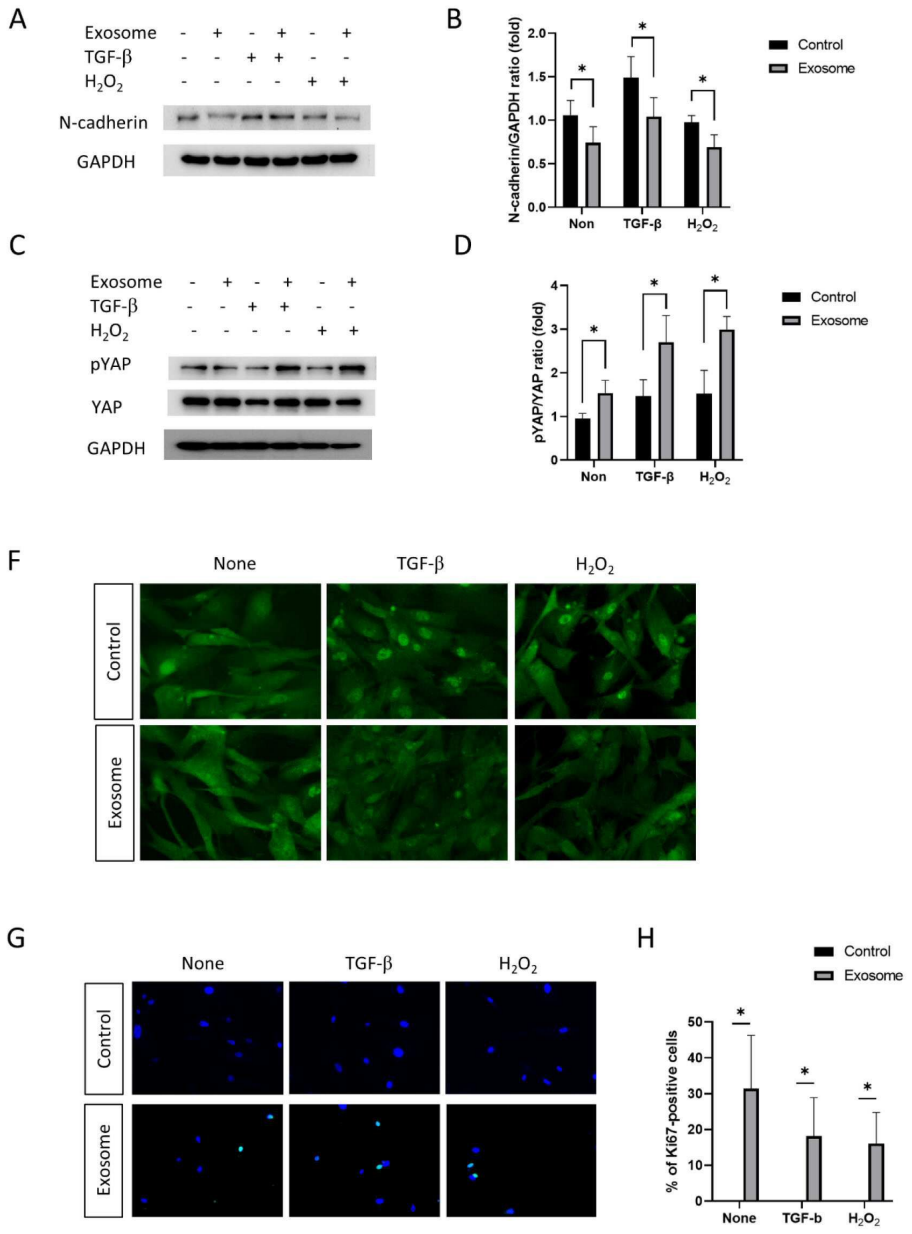
도면1


A
DiO-stained exosomes
Hoechst33342
Merged
Control
Exosome
B
Cell viability (fold)
Control
Exosome
C
Control
Exosome
G0G1(79.52%)
S(2.31%)
G2M(17.21%)
G0G1(73.61%)
S(5.81%)
G2M(19.41%)
Count
D
% of cells in G0/G1-phase
E
% of cells in S-phase
F
% of cells in G2/M-phase

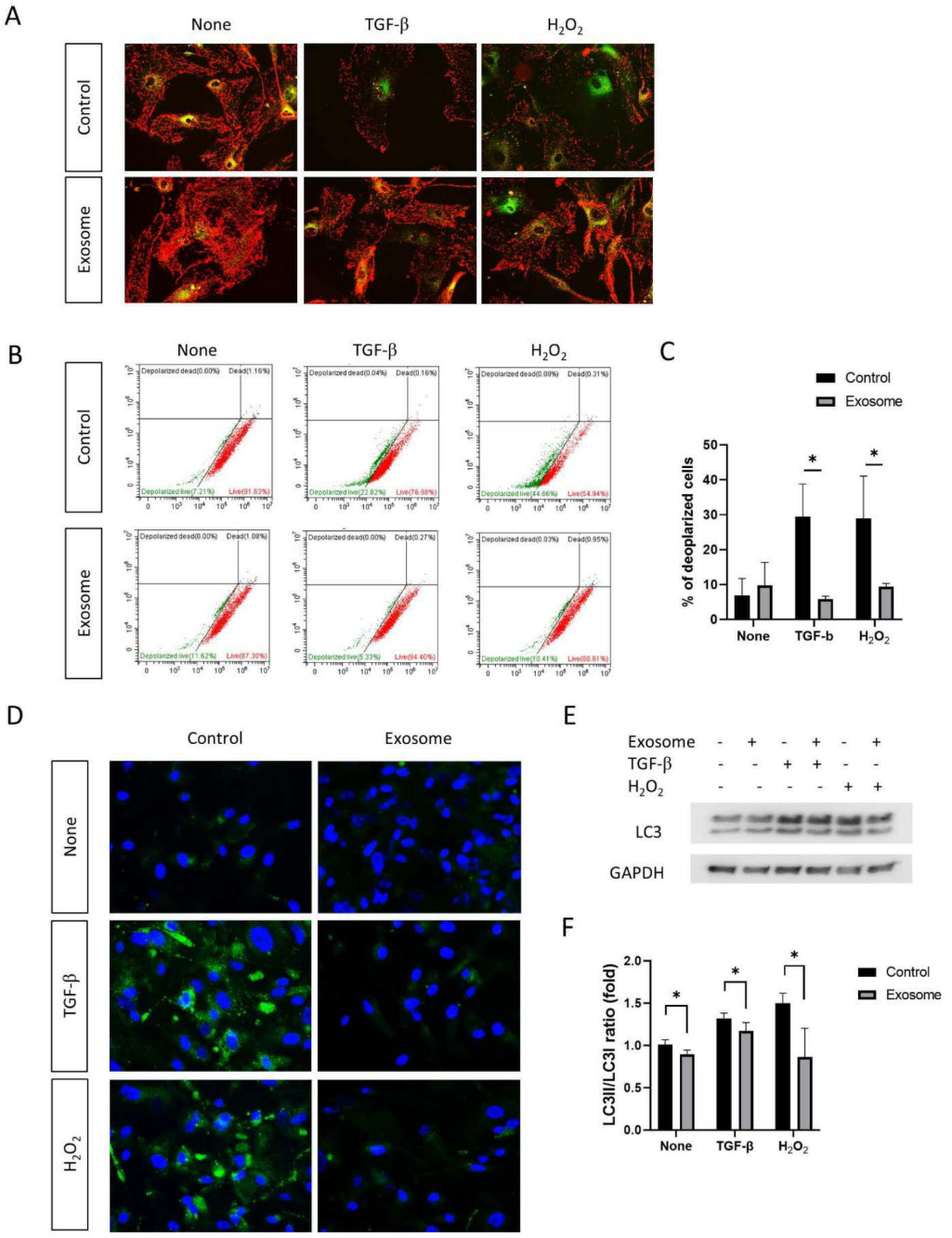
도면2


A
Cell viability (fold)
Control
TGF-β
TGF-β + Exosome
H2O2
H2O2 + Exosome
B
LDH cytotoxicity (fold)
C
None
TGF-β
H2O2
Control
Exosome
D
% of cells with high ROS
Control
Exosome
None
TGF-b
E
F
% of SA-β-gal positive cells

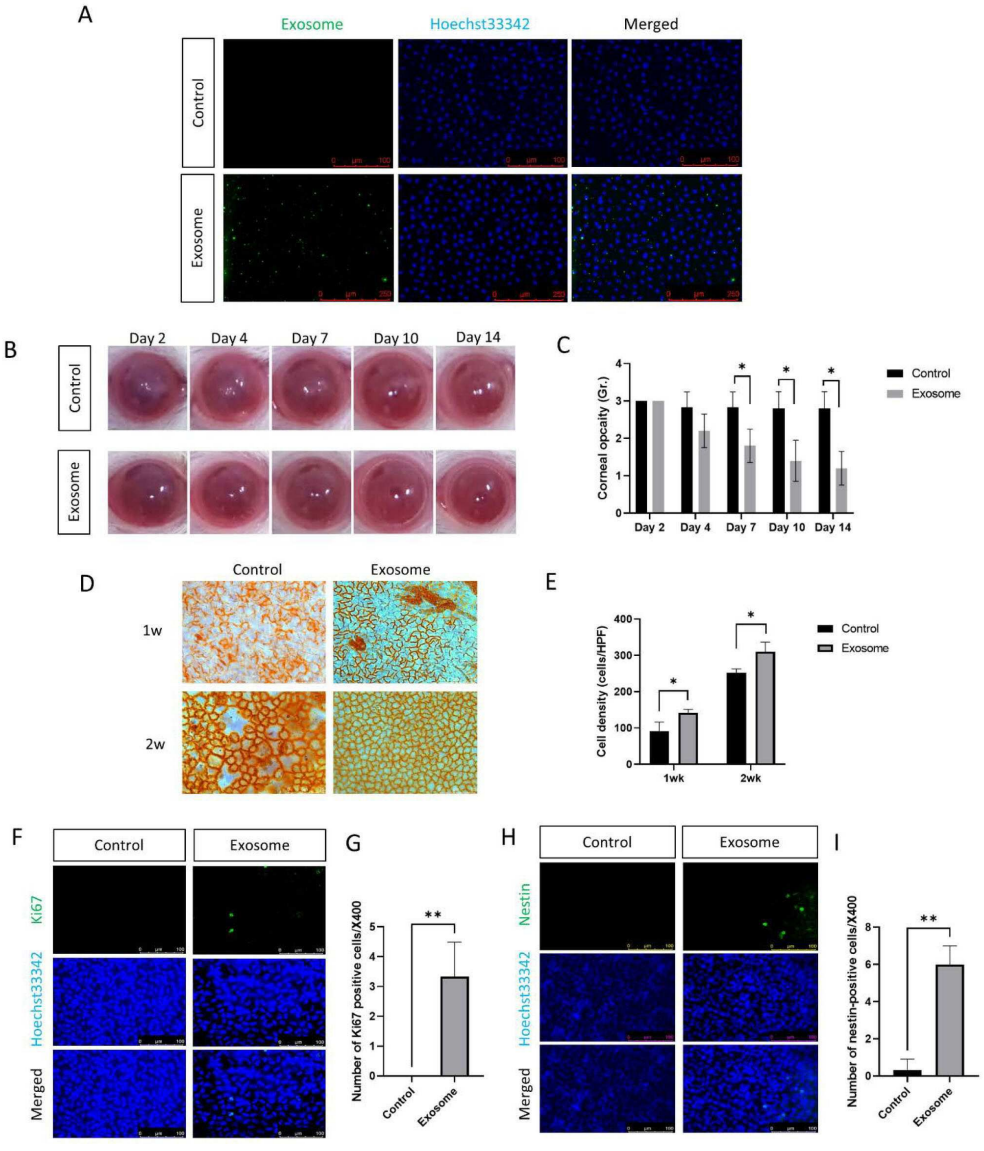
도면3


A
Exosome - + - + - +
TGF-β - - + + - -
H_2O_2 - - - - + +
N-cadherin
GAPDH
B
N-cadherin/GAPDH ratio (fold)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Non
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
C
Exosome - + - + - +
TGF-β - - + + - -
H_2O_2 - - - - + +
pYAP
YAP
GAPDH
D
pYAP/YAP ratio (fold)
4
3
2
1
0
Non
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
F
None
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
G
None
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
H
Control
Exosome
% of Ki67-positive cells
50
40
30
20
10
0
None
TGF-b
H_2O_2

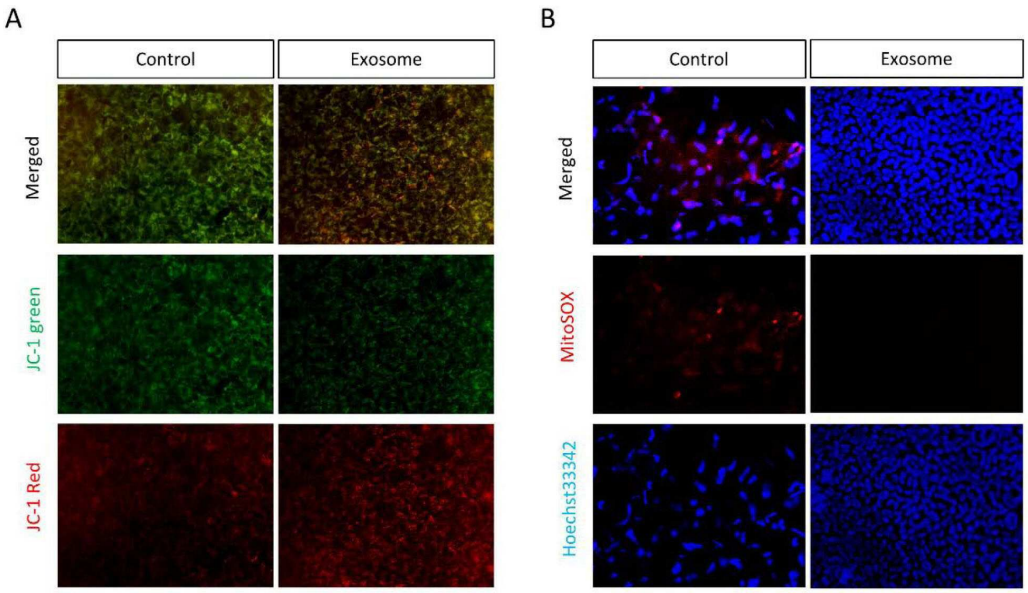
도면4


A
None
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
B
None
TGF-β
H_2O_2
Control
Exosome
C
Control
Exosome
% of deoplarized cells
None
TGF-b
H_2O_2
D
Control
Exosome
None
TGF-β
H_2O_2
E
Exosome
TGF-β
H_2O_2
LC3
GAPDH
F
LC3II/LC3I ratio (fold)
Control
Exosome
None
TGF-β
H_2O_2

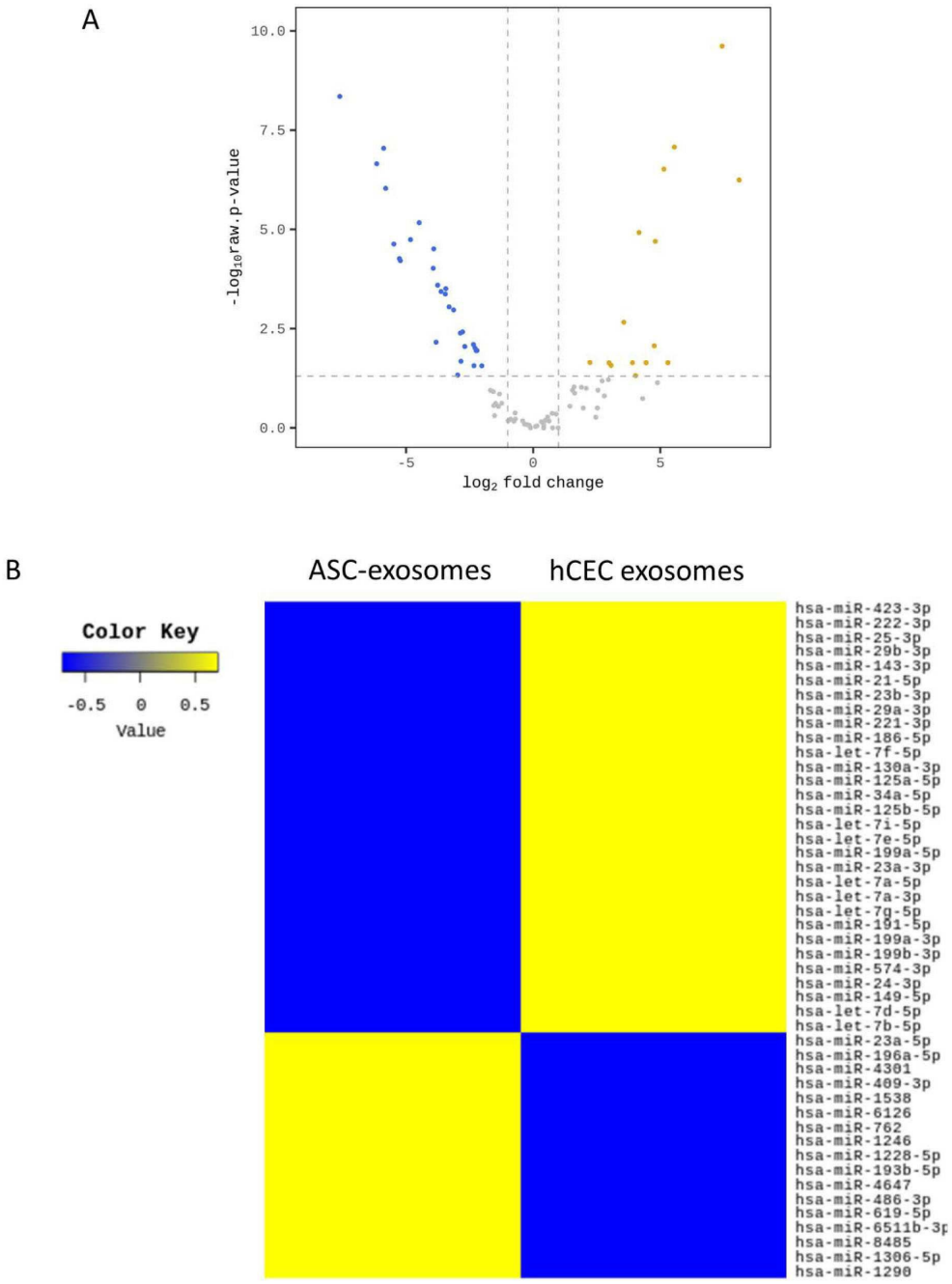
도면5


A
Exosome
Hoechst33342
Merged
Control
Exosome
B
Day 2
Day 4
Day 7
Day 10
Day 14
Control
Exosome
C
Corneal opcaity (Gr.)
Control
Exosome
D
Control
Exosome
1w
2w
E
Cell density (cells/HPF)
1wk
2wk
Control
Exosome
F
Control
Exosome
Ki67
Hoechst33342
Merged
G
Number of Ki67 positive cells/X400
Control
Exosome
H
Control
Exosome
Nestin
Hoechst33342
Merged
I
Number of nestin-positive cells/X400
Control
Exosome

도면6


A
Control
Exosome
Merged
JC-1 green
JC-1 Red
B
Control
Exosome
Merged
MitoSOX
Hoechst33342

도면7


A
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
-log10raw.p-value
-5
0
5
log2 fold change
B
ASC-exosomes
hCEC exosomes
Color Key
-0.5
0
0.5
Value
hsa-miR-423-3p
hsa-miR-222-3p
hsa-miR-25-3p
hsa-miR-29b-3p
hsa-miR-143-3p
hsa-miR-21-5p
hsa-miR-23b-3p
hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-221-3p
hsa-miR-186-5p
hsa-let-7f-5p
hsa-miR-130a-3p
hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-125b-5p
hsa-let-7i-5p
hsa-let-7e-5p
hsa-miR-199a-5p
hsa-miR-23a-3p
hsa-let-7a-5p
hsa-let-7a-3p
hsa-let-7g-5p
hsa-miR-191-5p
hsa-miR-199a-3p
hsa-miR-199b-3p
hsa-miR-574-3p
hsa-miR-24-3p
hsa-miR-149-5p
hsa-let-7d-5p
hsa-let-7b-5p
hsa-miR-23a-5p
hsa-miR-196a-5p
hsa-miR-4301
hsa-miR-409-3p
hsa-miR-1538
hsa-miR-6126
hsa-miR-762
hsa-miR-1246
hsa-miR-1228-5p
hsa-miR-193b-5p
hsa-miR-4647
hsa-miR-486-3p
hsa-miR-619-5p
hsa-miR-6511b-3p
hsa-miR-8485
hsa-miR-1306-5p
hsa-miR-1290