



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

엑소좀의 생체 분포 평가 기술 개발

Development of Biodistribution Evaluation of
Exosomes

울산대학교 대학원

의과학과

김미연

엑소좀의 생체 분포 평가 기술 개발

지도교수 김정곤

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 8월

울산대학교 대학원
의 과학과
김미연

김미연의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원	김 정 곤	(인)
심사위원	김 상 엽	(인)
심사위원	백 찬 기	(인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 8월

국문요약

엑소좀은 모든 세포에서 분비하는 나노 크기의 정보 전달체이다. 지질이 중층막으로 되어있으며 mRNA와 miRNA 같은 풍부한 생물학적 정보를 포함하고 있다. 엑소좀은 최근 바이오마커나 비세포치료제로서 연구가 많이 진행되고 있다. 이러한 엑소좀은 크기가 작아 체내 다양한 장기에 도달하여 흡수되기 때문에 원하는 장기뿐 아니라 다른 장기에 도달하여 조직 및 세포에 흡수될 수 있어 약물의 효과적 용량과 잠재적 부작용 예측을 위하여 약물 개발의 전제조건으로 생체 내 분포 실험이 필요하다.

생체내 분포를 이미지화 할 수 있는 광학영상(optical imaging)은 생체내 이미지를 비침습적이며 반복 측정이 가능하여 실험기간과 개발비용을 최소화할 수 있다. 엑소좀의 생체 분포를 광학영상으로 분석하기 위해서는 엑소좀을 영상 분석에 적절한 프로브 표지가 필요하다. 그러나, 기존 엑소좀의 표지 방법에는 엑소좀의 기능이나 특성에 영향을 주거나 시간이 지날수록 프로브가 엑소좀에서 떨어져 분리된 프로브로 인해 배경 신호가 나타날 수 있는 단점이 있다. 이를 보완하는 공유결합을 이용한 형광표지법을 통해 엑소좀을 표지한 후 투여 경로를 고려한 생체 분포시험 연구가 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 엑소좀의 형광 표지법을 확립을 위하여 형광 표지된 엑소좀의 구조변화의 유무와 형광표지 효율을 검증하며, 형광 표지된 엑소좀을 마우스에 주사하여 광학영상을 통해 시간의 흐름에 따른 생체 분포를 확인하였다.

차 례

요약	i
그림목차	iii
서론	1
연구 대상 및 방법	9
결과	13
결론 및 고찰	30
참고문헌	31
영문요약	36

그림목차

표 1	15
표 2	22
그림 1	1
그림 2	6
그림 3	16
그림 4	17
그림 5	18
그림 6	20
그림 7	23
그림 8	24
그림 9	26
그림 10	29

서론

전세계적으로 세포외소포를 차세대 치료제로 개발하기 위한 기초 연구개발이 활발히 진행되고 있으며, 산업적으로도 다수의 국내외 기업이 세포외소포를 의약품으로 개발하기 위한 응용연구와 인프라 개발을 발빠르게 추진하는 등 세포치료제의 대안으로 부각되고 있으나, 약동 및 흡수, 분포, 대사, 배설 시험의 평가를 위한 적절한 분석 기법 및 이를 평가하기 위한 기준에 대한 연구가 필요하다.

세포외소포(Extracellular Vesicles; EVs)는 세포에서 유래하는 이중 지질막 구조의 물질을 의미하며, 세포외소포치료제는 살아있는 세포에서 분비되는 세포외소포를 분리, 정제하여 제조하는 의약품으로 정의된다. 세포외소포는 형성 과정에 따라 1) 세포막이 세포 내부로 함입되어 엔도솜을 형성하고 다시 엔도솜막이 내부로 함입되어 작은 소포를 다수 포함하는 다소포체(multivesicular body)가 세포막과 융합하여 내부의 작은 소포를 세포 외부로 분비하여 만들어지는 엑소솜(exosome) 2) 세포막이 세포 바깥으로 돌출하여 떨어져 나와 형성되는 미세소포(microvesicle) 및 3) 세포사멸(apoptosis) 과정에서 세포 분해물들이 포함된 막구조가 형성되는 세포사멸체(apoptotic body)로 나뉜다¹.

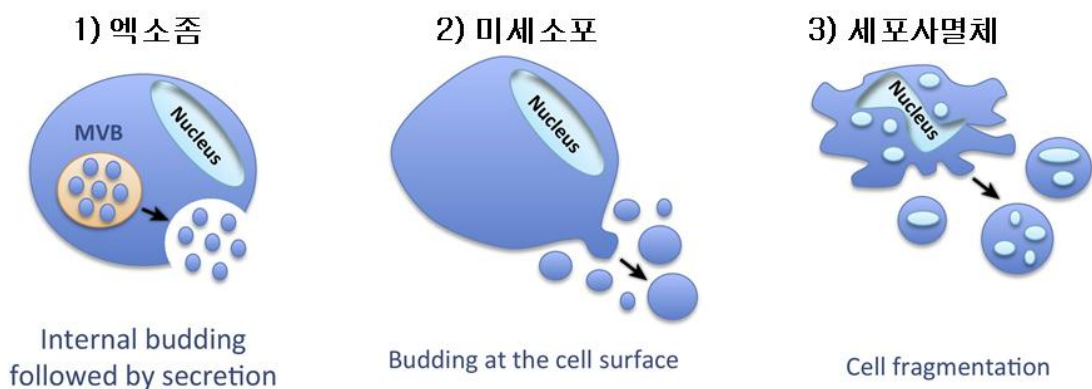


Figure 1. 세포외소포의 종류³

세포외소포 중 세포가 사멸하며 형성되는 세포사멸체는 유익한 약리기전이 없을 것으로 이해되고 있다. 따라서 치료제를 목적으로 개발되는 세포외소포는 미세소포와 엑소솜을 포함하며, 이중에서도 특히 연구개발이 많이 진행된 엑소솜이 차세대 치료제로서 크게 주목받고 있다². 엑소솜 특이적인 마커로는 엑소솜 내부에 존재하는 것으로 알려진 Alix, TSG101 등과 엑소솜 표면에 존재하는 CD63, CD9, CD81 등이 알려져 있으며, 기원 세포의 종류에 따라 발현 정도에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 줄기세포(stem cell)가 분비하는 엑소솜은 줄기세포의 재생/치유 능력, 항염증, 면역조절 능력과 관련된 물질들이 다량 함유되어 있어 차세대 미세포치료제(cell-free therapy)로 활발한 연구개발이 진행되고 있다.

엑소솜은 세포에서 분비하는 30-200nm의 크기의 지질이중층막 소포체이다⁴. 세포막이 세포 내부로 함입되어 생성된 엔도솜의 막이 다시 엔도솜 내부로 함입되어 다중 소포 엔도솜(multi-vesicular endosomes)내에 내강 소낭(intraluminal vesicles)이 생성되었다가 다중 소포 엔도솜이 세포표면과 결합하여 내강소낭이 세포 밖으로 분비되어 엑소솜이 생성된다⁵⁻⁶.

엑소솜은 유래 세포의 DNA, mRNA, 단백질, 핵산 등의 활성물질을 가지고 있다. 엑소솜내 활성물질은 유래세포의 종류와 상태에 따라 다르다⁷⁻¹¹. 엑소솜에 의한 세포 간 신호 전달은 수용 세포의 기능적 상태를 직접적으로 변화시키며 다양한 생리적, 병리학적 과정을 조절한다¹²⁻¹³.

이러한 특성으로 엑소솜은 다양한 질병 상태의 진행을 추적할 수 있는 생물학적 지표 (biomarker)와 치료제로서 연구되고 있다¹⁴⁻²⁰. 침습적 방식인 조직생검(tissue biopsy)은 위치나 크기, 환자의 상태에 따라 시행이 불가능할 수 있으며, 종양의 이질적 특징 때문에 감지를 못하는 경우가 있을 수 있는데 바이오마커로서 엑소솜을 사용하게 되면 비침습적이며 조직생검과 달리 검체 채취 시간이 짧고 반복 검사가 쉬워 지속적인 모니터링이 가능하다는 장점이 있다.

또한 엑소솜은 기존 약물 전달 시스템과 달리 표적세포에 전달률이 높고 생체 유래 물질로 면역원성이 적으며, 세포막 구조와 같은 지질 이중층막을 가져 내부 물질을 안정적으로 전달할 수 있는 장점을 가져 약물전달체로 큰 장점을 가진다²¹⁻²⁴.

앞서 언급한 바와 같이 엑소솜은 크기가 나노 수준으로 세포 크기 (10,000~20,000 nm) 보다 훨씬 작기 때문에 세포 치료제의 잠재적 위험 요소인 색전증(embolism)의 염려 없이 다양한 투여 경로로 투여가 가능하다²⁵. 또한, 세포와 달리 자가 복제할 수 없기 때문에 종양 형성의 위험이 매우 낮다²⁶. 또한, 엑소솜의 경우, 세포치료제와 대비하여 제균이 가능하고, 상대적으로 긴 보존기간(shelf life)이 예상되며, 다양한 품질관리(quality control) 이후에 제품 출하가 가능한 장점을 보유하고 있다²⁷.

줄기세포 유래 엑소솜이나 HEK293T 세포 유래 엑소솜은 체외 시험 및 생체 시험에서 독성을 유발하지 않는 것으로 보고되었다²⁸. 특히, 인체 줄기세포 유래 엑소솜의 경우, 면역반응을 일으킬 수 있는 MHC Class I (또는 HLA Class I), Class II (또는 HLA Class II) 또는 CD80 및 CD86 등과 같은 co-stimulatory molecules이 존재하지 않는 것으로 보고되고 있어, 치료제로 개발 시 면역 거부 반응을 일으키지 않을 것으로 예상되고 있다²⁹⁻³⁰. 아울러, 인체 줄기세포 유래 엑소솜을 장기간 반복적으로 마우스에 투여한 경우에도 특별한 면역 독성을 유발하지 않는 것으로 보고되었다²⁹. 그러나, 정맥주사와 같은 전신 투여의 경우 나노 크기의 엑소솜은 원하는 장기뿐만 아니라 다양한 장기에 도달하여 조직 및 세포에 흡수될 수 있다. 따라서, 엑소솜을 치료제로 개발하기 위해서는 투여 경로를 고려한 엑소솜의 생체 분포시험 평가가 필수적으로 수행되어야 할 것이다.

엑소솜의 생체 분포를 분석하기 위해서는 엑소솜을 영상분석에 적절한 프로브(probe)로 표지(labeling)하여야 한다. 프로브를 표지하는 방법으로는 공유결합(covalent binding), 유전공학적 조작(genetic modification), 세포외소포막 삽입(membrane integration), 프로브의 내재화(encapsulation), 대사 표지(metabolic labeling) 등의 방법을 사용할 수 있다.

공유결합을 이용하여 엑소솜을 표지하는 방법은 작용기를 갖는 프로브를 엑소솜에 존재하는 단백질에 반응시켜 이루어진다. 프로브가 단백질과 공유결합을 이루기 때문에 쉽게 떨어지지 않는 장점을 가지나, 엑소솜에 존재하는 단백질이 아닌 경우에도 표지될 수 있고, 엑소솜 막 단백질의 기능을 변화시켜 엑소솜과 표적 세포 간의 상호작용에 영향을 줄 수 있다. 일례로 최근 연구결과에 따르면 세포외소포에 글라이코시데이즈(glycosidase)를 처리 전후를

비교한 결과 세포외소포의 주요 분포 장기가 변화되는 것이 보고되었다³¹. 글라이코시데이즈를 처리하지 않은 세포외소포를 정맥주사한 경우 간조직에 분포가 확인되었으나, 글라이코시데이즈를 처리한 세포외소포를 정맥주사한 경우 폐조직에 분포되는 것이 증가하였다. 그러나 분석에 사용된 실험 동물의 개체수가 각 시험군 당 3마리에 지나지 않아 충분한 통계적 분석을 위해서는 추가 연구가 필요한 것으로 보인다. 또한 레닐라 루시퍼레이즈가 탑재된 엑소솜을 친유성 형광 염료로 염색하여 염색하지 않은 엑소솜과 분포를 비교한 사례에서도, 분포의 경향이 다소 달라지는 것이 보고된 바 있다²³. 친유성 형광 염료로 염색하지 않은 경우 폐, 간, 비장, 신장의 순서로 분포되던 세포외소포가 친유성 형광 염료로 염색한 경우에는 간, 폐, 비장의 순서로 분포되는 것이 확인되었다.

엑소솜을 생산하는 세포에 유전자 조작을 통하여 형광 단백질이나 루시퍼레이즈(luciferase) 등을 발현시킨 후 엑소솜 내부로 탑재(loading)되게 하면 엑소솜 표면의 변형을 피할 수 있다. 현재까지의 연구 결과를 분석한 결과 유전공학적 조작으로 형광 단백질을 엑소솜을 표지하여 생체 분포분석에 적용한 사례는 없었으며, 모두 루시퍼레이즈 단백질을 사용하고 있었다. 그러나 생산 세포의 유전적 변화를 초래하기 때문에 생산 세포 자체의 특성이나 생산되는 세포외소포의 특성을 변화시킬 수 있고, 발현된 프로브 단백질이 세포외소포에 불균일하게 탑재될 수 있는 등의 단점을 갖고 있다³⁸

엑소솜의 표지에 가장 널리 사용되는 방법은 친유성 형광 염료(lipophilic fluorescent dyes)를 엑소솜 막에 삽입(integration)시켜 염색하는 방법이다. 조작이 단순하고 손쉬운 장점이 있으나, 엑소솜이 덩어리지는 것을 유발할 수 있고²³, 엑소솜 이외에도 지질 단백질(lipid proteins)이나 지질 입자(micelle) 등이 염색될 수도 있다. 또한 엑소솜 막의 삽입된 위치에서 분리되어 나와 세포를 염색시켜 비특이적 배경 신호(background signals)을 발생시킬 수도 있다. 그럼에도 불구하고 친유성 형광 염료는 실제 세포치료제 개발 과정에서 세포를 염색한 후 생체 내에서 세포를 추적하는 데 사용되어 왔다. PKH67이나 Dil 염료로 염색된 세포와 염색하지 않은 세포를 공배양하여 연구한 결과에 따르면, 염색된 세포로부터 염색되지 않은 세포로 염료가 전이되는 현상은 관찰되지 않았다³². 한편 생체 내에서 반감기가 긴 친유성 형광

염료는 엑소솜이 분해되어 사라진 후에도 생체 내에 잔존하여 위양성 신호(pseudo signals)을 야기할 가능성도 있는 것으로 보고 있다. 이와 관련하여 친유성 형광 염료인 PKH 염료는 상당히 긴 생체 내 반감기를 갖는 것으로 알려져 있다. 보고된 바에 따르면 PKH 염료의 in vivo 반감기는 PKH2는 12일이고, PKH26의 경우에는 그 반감기가 100일이 넘는 것으로 알려져 있다³³. PKH 염료와 유사한 dialkylcarbocyanine 염료들(DiD, DiI, DiO, DiR 등)도 널리 사용되는 데, DiR의 경우는 생체 내에서 4주 정도 유지되는 것으로 알려져 있다³⁴. 따라서 친유성 형광 염료만을 반응시킨 대조군을 적절히 사용하는 것이 필요해 보인다²⁸. 친유성 형광 염료의 또 다른 현상으로 수용액에서 마이셀(micelle)을 형성하는 것이 보고되어 있다³⁵. PKH26이나 CM-DiI을 인산완충용액(PBS)와 반응시키면 검출 가능한 수준의 입자가 형성된다는 것이다. 그러나, 본 연구진의 자체 연구결과에 따르면 적절한 조건에서 PKH 염료와 세포외소포를 반응시키는 경우 염색 전후에 입자의 숫자 변화가 없음을 확인한 바 있다. 같은 조건에서 음성대조군으로 PKH 염료와 PBS를 반응시킨 경우에도 새로운 입자가 형성되는 것이 관찰되지 않았다. 따라서 친유성 형광 염료로 세포외소포를 염색할 경우에는 반드시 엑소솜에 염색되지 않은 잔존 친유성 형광 염료 제거 및 친유성 형광 염료와 완충용액만을 반응시킨 조건을 음성대조군으로 포함하여 시험을 진행하는 것이 중요한 것으로 사료된다.

한편 엑소솜 내부로 프로브를 내재화(encapsulation)시켜 표지하는 방법도 사용된다. 역시 엑소솜 표면에 변형이 가해지지 않는 장점을 가질 수 있으나, 전기천공(electroporation)의 경우, 세포외소포막 구조를 변형시켜 융합이 일어나게 하거나 응집이 일어나게 할 수 있는 단점이 있다²³. 친유성 물질을 이용한 경우에는 엑소솜 내부에 내재화되었던 프로브가 서서히 방출될 수 있는 가능성도 배제하기 어렵다. 또한, 매우 이례적인 예로 세포외소포막에 존재하는 수송단백질(transporter)를 이용한 경우, 세포 특이적으로 사용이 제한될 수 있고, 각 세포외소포막 상에 존재하는 수송단백질의 양적 차이에 따라 불균일한 탑재가 예상된다.

엑소솜을 생산하는 세포의 배양 과정에서 표지에 사용할 수 있는 물질을 미리 첨가하여 대사적으로 표지가 가능한 엑소솜을 생산할 수도 있다. 최종적으로 프로브의 표지는 클릭 화학(click chemistry)를 이용한 공유결합

표지가 가능하지만, 역시 세포 배양 과정에서 첨가되는 물질에 의해 세포나 엑소솜의 특성이 변화될 가능성을 배제하기 어렵다.

엑소솜 분포시험의 동향을 파악하기 위하여 엑소솜의 분포를 연구보고한 29건의 논문을 분석하여 총 38가지 조건에 대한 분석을 수행하였다. 그 결과 다양한 표지 방법 중 세포외소포막에 친유성 프로브를 삽입하는 방법이 가장 널리 사용되는 것이 확인되었다. 그 다음으로 공유결합 방식, 내재화(encapsulation) 방식 및 유전공학적 엔지니어링 방식이 사용되었으며, 대사 표지 방식은 단 1건만이 보고되고 있다.

유전공학적 엔지니어링 방식은 4건 모두 루시퍼레이즈를 사용하였으며, 형광 단백질을 생체 분포시험에 사용한 사례는 찾을 수 없었다. 이는 형광 단백질의 투과도가 좋지 않아 비침습적 생체 이미징에는 적합하지 않았기 때문인 것으로 이해된다. 앞서 언급한 것처럼 유전공학적 엔지니어링은 생산 세포의 유전적 변화를 초래하기 때문에 생산 세포 자체의 특성이나 생산되는 세포외소포의 특성이 달라질 수 있다. 특히 치료제로 개발하고자 하는 세포외소포에 추가적으로 프로브 단백질을 발현시키게 되므로 실제 관심의 대상이 되는 세포외소포와는 다른 세포외소포의 분포를 분석할 수밖에 없는 단점이 있다. 그러나, 프로브 단백질이 유전공학적으로 조작된 세포외소포를 다른 방식의 프로브로 추가 표지하여 그 분포를 비교해 볼 수 있는 장점을 갖는다. 특히 세포외소포막 표면을 표지하는 경우 세포외소포막의 미세 구조 변화가 세포외소포의 분포에 미치는 영향을 분석해 볼 수 있다²³.

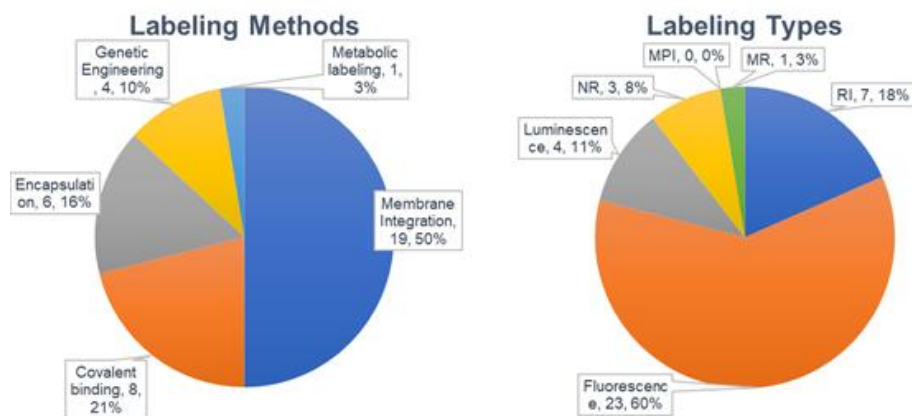


Figure 2. 세포외소포의 분포시험을 위해 사용되는 프로브의 표지 방식과 프로브 유형 분석 결과.

프로브의 내재화 방식은 총 6건의 사례가 보고되어 있으며, 방사성 동위원소, 나노입자, 형광 염료가 사용되고 있다. 세포외세포 내부로 프로브를 내재화시키는 방법으로는 수동적으로 단순 혼합 반응에 의한 것이 3건 보고되고 있다. 보다 능동적인 방법으로는 세포외세포막에 존재하는 글루코스 수송단백질 Glut1을 활용하여 글루코스가 코팅된 금 나노입자를 내재화한 방법이 보고되었는데³⁶, 추가 연구개발에 의하여 세포막세포막에 존재하는 다양한 수송단백질이 밝혀진다면 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또 다른 능동적인 방법으로는 클로린 형광 프로브를 초음파 처리에 의해 내재화한 방법이 있다³⁷. 그러나 세포외세포에 초음파를 처리할 경우 세포외세포 막의 구조가 손상될 우려가 있어, 실제 비처리 세포외세포의 분포와는 다른 생체 내 분포 양상을 보일 가능성도 배제하기 어렵다. 한편 내재화하는 프로브로 금 나노입자나 초상자성 산화철(superparamagnetic iron oxide; SPIO) 입자가 사용된 사례가 보고되었는데^{36,38}, 나노 입자의 크기를 고려하여 충분한 양의 프로브가 세포외세포 내부로 내재화될 수 있도록 해야 할 것으로 보인다. 실제로 자성 입자 영상분석을 위해 세포외세포 내부로 내재화에 사용된 VivoTrax SPIO 입자의 크기는 유체역학적(hydrodynamic) 직경이 62 nm로 알려져 있다. 비록 SPIO 입자를 세포외세포에 내재화하기 위하여 SPIO 입자를 세포에 처리한 후 SPIO 입자가 transfection된 세포로부터 세포외세포를 얻었지만, 확인된 세포외세포의 직경이 100 nm 내외인 것을 볼 때, 충분한 양의 SPIO 입자가 내재화되기에는 어려울 것으로 보인다³⁶.

공유결합 방식으로 프로브를 표지한 8건중 3건은 형광 염료를 표지하였고, 5건은 방사성 동위원소를 표지하였다. 공유결합 방식은 결합된 프로브가 세포외세포로부터 분리될 가능성이 낮아 위양성 신호의 우려가 적다는 장점이 있다. 그러나, 세포외세포의 표면 단백질이나 세포외세포막의 미세구조가 세포외세포의 생체 내 운명을 결정짓는 데 영향을 줄 가능성이 높기 때문에 세심한 주의가 필요하다^{31,39}.

압도적으로 널리 사용되는 표지 방식은 친유성 프로브를 이용한 엑소솜 삼입 방법이다(Figure 2 왼쪽). 분석된 방법 중 50%에 달하는 19건이 친유성 프로브를 사용하였으며, 이 경우 모두 형광 염료를 사용하였다. 세포외분포의 분석을 위한 프로브 유형은 형광이 압도적임을 알 수 있다(Figure 2 오른쪽).

23건의 사례를 분석한 결과, 절반이 넘는 경우가 DiR 형광 염료를 사용하였다. 특히 Dialkylcarbocyanine 염료의 일종인 DiR은 근적외선 형광 염료로서 생체 물질에 의한 흡수가 적어 생체 이미징에 적합하기 때문에 널리 사용되는 것으로 이해된다⁴⁰. 친유성 형광 염료는 수용액에서 그 자체로 마이셀을 형성할 수 있는 것으로 보고되어 있기 때문에³⁵, 표지 전후에 입자 수의 변화가 있는지 확인하는 것이 중요할 것이다. 또한, 음성대조군으로서 친유성 형광 염료를 적절히 희석하여 사용하거나²⁸, 친유성 형광 염료와 완충용액만을 반응시킨 후 엑소솜 반응액과 동일한 분리 과정을 거쳐 엑소솜에 염색되지 않은 잔존 염료를 제거한 후 음성대조군으로 사용하는 것이 바람직할 것이다.

광학영상은 영상분석장비를 통해 생체내에서 일어나는 현상을 영상화하는 기술로 약물의 흡수, 분포, 대사, 분비에 대한 정보를 얻을 수 있으며, 신약개발과정에서 약물의 표적장기로의 전달을 알 수 있다. 광학 영상은 동일 개체에서 연속적으로 데이터를 얻을 수 있으며, 전신 및 표적 주위의 약동학을 비침습적이며 정량적으로 평가할 수 있어 시간과 비용 감소의 장점이 있다⁴¹⁻⁴⁴. 광학 영상을 위해서는 표지물질이 필요하다.

엑소솜의 생체 분포를 광학영상으로 분석하기 위해서는 엑소솜을 영상 분석에 적절한 프로브 표지 방법이 필요하다. 엑소솜의 표지 방법은 유전공학 엔지니어링, 막 삽입, 공유 결합 방식 등이 있다. 유전공학 엔지니어링은 세포를 유전적으로 변화시켜 세포의 특성이 변형되어 생산되는 엑소솜의 특성이 달라질 수 있는 단점을 가진다. 공유 결합 방식은 결합된 프로브가 엑소솜에서 분리될 가능성이 낮아 떨어져 나온 프로브가 이미징 되는 일이 적다는 장점이 있다⁴⁵⁻⁵⁰.

본 시험에서는 NHS를 이용한 공유결합 방식으로 엑소솜 막 단백질에 직접 표지하였으며, Exosome Spin Column을 이용하여 표지된 엑소솜과 형광염료를 분리하였다. 또한, 자가 형광 분리 기술(spectrum unmixing)과 근적외선 염료 표지로 최적의 형광 이미징을 위한 표지 방법을 적용하였다. 엑소솜에 형광 표지 후 FCS, NTA, TEM, live cell imaging을 통해 물리화학적 특성을 검증한 후 마우스 꼬리 정맥에 주입하여 생체내 분포를 확인하였다.

실험 재료 및 방법

HEC293에서 엑소좀 분리

HEC293 세포를 10% FBS(Biowest, Nuaille, France)와 Gibco™ 1% Antibiotic-Antimycotic(Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)이 첨가된 DMEM high 배지(Biowest, Nuaille, France)를 이용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 37°C incubator에서 24시간 배양 후 serum free DMEM high 배지로 48시간 배양하였다. 세포 상등액을 conical tube에 옮겨 300g, 10분, 4°C으로 원심분리하였다. 세포 상등액을 새로운 conical tube에 옮겨 2000g, 10분, 4°C으로 원심분리 하였다. 세포 상등액을 BECKMAN tube (Beckman Coulter Inc., California, USA)에 옮겨 SW28 rotor를 이용해 7500rpm (10,000g), 30분, 4°C에 맞춰 L-100XP Ultracentrifuge(Beckman coulter Inc., Brea, CA, USA)로 초고속원심분리하였다. 세포 상등액을 새로운 BECKMAN tube에 옮겨 24,000rpm(100,000g), 70분, 4°C으로 초고속원심분리하였다. 상등액을 버린 후 차가운 PBS를 넣고 24,000rpm(100,000g), 70분, 4°C으로 초고속원심분리 하였다. 상등액을 버린 후 2000g, 5분, 4°C으로 원심분리 하여 -80°C에서 보관하였다.

NTA 측정

엑소좀의 정량을 위해 642nm 레이저가 장착 된 NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom)을 분석에 사용하였다. 회석된 엑소좀을 분석하기 위해 카메라 레벨을 14로 유지하고 10초 간격으로 30개 비디오를 초당 30프레임의 속도로 촬영하였다. 크기 분포에서 통계적으로 중요하지 않은 피크를 방지하기 위해 최소 2,000개의 입자를 추적하고 분석하였다. 데이터는 NTA 3.0 소프트웨어로 분석하였다.

엑소좀 형광 표지와 농축

HEC293 세포에서 분리한 엑소좀을 형광 표지하기 위해 엑소좀 100 μ L에 1M NaHCO₃ 용액 10 μ L과 10mg/ml의 Flamma 675 NHS(BioActs, Incheon, Korea) 10 μ L를 넣어 incubator에서 1시간 반응시켰다. 형광 표지된 엑소좀과 형광 염료를 분리하기 위해 Invitrogen™ MW3000 Exosome spin column (Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하였다. Column 에 1x PBS 650 μ L를 넣고 실온에서 15분 반응시킨 후 2ml collection tube에 꽂아 750g, 2분, 상온으로 원심분리하였다. Collection tube를 버리고 형광 표지된 엑소좀 50 μ L를 gel 가운데에 loading 후 spin column을 1.5ml elution tube에 꽂아 750g, 2분, 상온으로 원심분리하였다. Spin column은 버리고 용출된 형광 표지된 엑소좀은 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

형광 표지된 엑소좀 NTA 측정 및 TEM(전자현미경) 이미징을 통한 구조변화의 유무 검증

형광 표지된 엑소좀의 크기와 입자수를 측정하기 위해 NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom)를 사용하였다. 형광 표지된 엑소좀을 PBS에 희석한 현탁액을 chamber에 넣고 측정한 후 NTA 3.0 소프트웨어로 분석하였다.

엑소좀과 형광 표지된 엑소좀의 크기와 외관 변화의 유무를 확인하기 위하여 전자현미경으로 이미징을 하였다. 엑소좀을 2%Paraformaldehyde (PFA) 1ml로 5분간 고정하였다. 엑소좀 DPBS로 세척하고 Grid 표면에 놓고 1% uranyl acetate(UA)로 Grid를 염색한 후 80Kv 조건에서 이미징하였다.

FCS를 통한 형광 표지된 엑소좀

엑소좀 표지에 NaHCO₃의 영향과 엑소좀 1개당 표지되는 형광염료의 수를 확인 위해 형광염료 0.1mg과 NaHCO₃ 처리한 군과 NaHCO₃ 미처리한 군, 형광염료 0.01mg에 NaHCO₃ 처리한 군의 형광 농도를 FCS를 이용하여 측정하였다.

형광 상관 분광(Fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 측정이 가능한 LSM780 공초점 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)과 대물 렌즈(C-Apo 40 X/1.2 NA Water immersion)을 선택하였다. 준비한 실험군의 형광 표지된 엑소좀 용액 2 μ l를 각각 confocal microscopy 전용 8-well chambered coverglass(LabTek, Brendale, Australia)에 넣어준 후, LSM780 스테이지에 장착하였다.

레이저 633nm(헬륨네온레이저)의 출력을 0.2%로 설정하고, emission filter band(grating 가변형)는 650-700nm로 조정하여 GaAsp 검출기로 10초 동안 10회 이상 반복 측정하였다. 3회 측정으로 얻어진 형광 상관 함수(fluorescence auto-correlation function)를 3차원 two-component 모델식을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 시간에 따른 형광 강도 변화 및 형광 상관 함수로 계산했다. 이를 통하여, 염색이 된 형광 엑소좀과 free dye를 구분하여 절대 농도 및 상대적 농도 비를 산출하고, 염색된 엑소좀의 크기 및 단일 분자 당 형광 세기(brightness)를 측정하였다. 측정한 단일 엑소좀 당 형광 세기(cpm) 값을 free dye의 형광 세기(cpm) 값으로 나눠 단일 엑소좀 당 결합한 형광 염료의 개수를 계산하였다.

공초점 현미경을 실시간 세포 이미징

실시간 세포이미징을 통한 형광 표지된 엑소좀의 기능 분석을 위해 Raw 264.7 cell에 형광 표지된 엑소좀을 처리하여 Raw 264.7 cell의 세포막 주변과 세포내 분포 변화를 4D 컨포컬 이미징(LSM time-lapse)을 이용해 10분에서 1시간까지 10분 간격마다 실시간으로 촬영하였다.

IVIS 이미징을 통한 형광 표지된 엑소좀의 직진성 검증

형광 표지된 엑소좀의 농도가 증가함에 따라 영상 신호의 강도가 증가하는 것을 확인하기 위해 E-tube에 형광 표지된 엑소좀 3×10^9 , 1.5×10^9 , 6×10^8 , 3×10^8 , 3×10^7 particle/100 μ L을 넣고 IVIS spectrum (PerkinElmer, Inc., Waltham, USA)을 통해 이미징을 수행하였다. 또한 BALB/c-nu 마우스(JA BIO,

Inc., Suwon, Korea)의 피하에 형광 표지된 엑소좀 3×10^9 , 1.5×10^9 , 6×10^8 , 3×10^8 , 3×10^7 particle/100 μ L을 투여하고 IVIS spectrum으로 이미징을 수행하였다.

IVIS 이미징을 통한 형광 표지된 엑소좀의 생체 분포 평가

6 주령 수컷 BALB/c-nu 마우스에 형광 표지된 엑소좀 1×10^9 particle/200 μ L을 정맥 주사 후 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간 후에 호흡마취한 뒤 IVIS spectrum을 통해 in vivo 이미징을 수행하였다. 정맥 주사 후 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간 후에 마우스를 안락사하여 간, 비장, 신장, 폐, 심장, 췌장, 위, 소장, 대장을 추출하여 IVIS spectrum을 통해 ex vivo 이미징을 수행하였다.

결 과

형광염료와 분리된 표지된 엑소좀의 형광표지 효율 검증

기존 연구에 사용되는 형광이미징에 사용되는 염료는 지질 이중막 특이적 형광염료인 DiD, DiR 을 주로 사용이 되고 있었다. 이러한 염료는 시간이 지날수록 지질 이중막에서 확산이 되어 표지가 떨어져 나오는 단점이 있어 단백질 형광표지 기술을 이용하여 엑소좀의 최적 형광 표지법을 확립하였다.

엑소좀의 단백질 농도는 BCA 측정 결과 평균 30-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이며 입자수는 10^{10} - 10^{11} p/ml 이었다. 최적의 형광 표지 조건을 잡기 위하여 FITC-NHS 염료를 이용하여 표지 조건을 확립하였다.

2×10^9 개의 엑소좀에 염료 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg 을 처리하였다. 일반적으로 NaHCO_3 을 처리하여 pH 8-9 를 유지하여 최적 표지 효율을 높였다. 그러나 엑소좀에 영향을 조사하기 위해 NaHCO_3 을 처리하지 않은 시험군을 포함하여 표지 효율과 안정성을 조사하였다.

기존 단백질 표지법은 단백질의 양이 충분하며 측정이 용이하지만 엑소좀의 경우 표면에 노출된 단백질 양이 소량이며 고농도의 농축이 용이하지 않기 때문에 형광 염료와 표지된 엑소좀의 분리에 대한 최적 기술을 확립하였다.

기존에 PD-10 을 이용한 형광염료 분리 과정을 시행하였을 경우 회수율이 낮아 고농도의 엑소좀이 필요하였다. 소량의 표지 엑소좀과 형광염료 분리를 위해 Exosome Spin Column (MW3000)을 이용하여 최적 적용 부피를 설정하였으며 FCS 를 이용하여 검증하였다. 표지된 엑소좀과 free dye 가 제대로 분리된 것을 확인하였으며 최적 부피 이상을 적용하였을 때 분리가 잘 되지 않았다.

형광염료와 분리된 표지 엑소좀의 형광 표지 효율을 검증하기 위해서 기존 방법을 적용하였을때 소량임으로 새로운 정제 방법을 개발하여 광학이미징 기법을 이용하기위한 표지 방법을 확립하였다.

엑소좀의 물리화학적 특징 분석

HEK293에서 분리한 엑소좀과 형광 표지된 엑소좀의 특징 분석을 위해 NTA 측정과 TEM, FCS을 수행하였다. NTA 측정 결과 형광 표지된 엑소좀과 표지된 엑소좀의 평균 사이즈가 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (Table 1, Figure 1). TEM 이미지로 엑소좀 및 형광 표지된 엑소좀의 크기 및 모양을 확인할 수 있었다. 두 엑소좀은 40nm에서 100nm 사이의 직경과 구형을 보여졌다. TEM 이미지를 통해 두 엑소좀 사이의 특별한 차이점이 없어 형광 표지 과정에서 엑소좀 외형의 손상이 거의 없음을 확인할 수 있었다 (Figure 3 and 4).

형광 표지된 엑소좀을 물리화학적 특성 평가를 FCS 기법을 이용하여 최적화하였다. FCS/FCCS 및 4D 컨포컬이미징을 이용해 엑소좀-세포반응 정량화를 하였다. FCS/FCCS는 형광프로브 (면역항체, 세포외소포치료제 등)의 절대농도, 분자운동성(확산계수) 및 상호작용(약물-세포막)의 세기를 용액 및 live cell에서 직접 평가할 수 있는 고감도 형광분석법임으로 형광 표지된 엑소좀의 물리화학적 특징을 동정하는데 최적의 방법이었다. FCS를 이용하여 형광 표지된 엑소좀을 측정하였다 (Figure 5). 측정된 FCS를 분석하여 형광염료와 표지된 엑소좀이 잘 분리됨을 검증하였다. 형광의 농도를 FCS를 이용하여 측정하였으며 엑소좀에 형광염료 0.1mg에 NaHCO_3 처리 군의 경우 엑소좀 1개당 25개 염료가 표지되었다. NaHCO_3 미처리 군의 경우 엑소좀 1개당 13개 염료가 표지 되었으며 형광염료 0.01mg에 NaHCO_3 처리 군의 경우 엑소좀 1개당 6개 염료가 표지되었다. 형광염료 0.001mg의 경우 4개 염료가 표지되었음을 알 수 있었다.

Table 1. 엑소좀과 형광표지된 엑소좀의 NTA 측정

Sample	Exosome	Exosome-675
Mean size (nm)	147.2 ± 2.2	152.9 ± 2.4
Mode size (nm)	136.7 ± 2.4	141.6 ± 4.4
D50 size (nm)	139.2 ± 1.7	145.1 ± 2.5
Conc. 10 ⁸ p/mL	1470 ± 142	1.37 ± 0.14

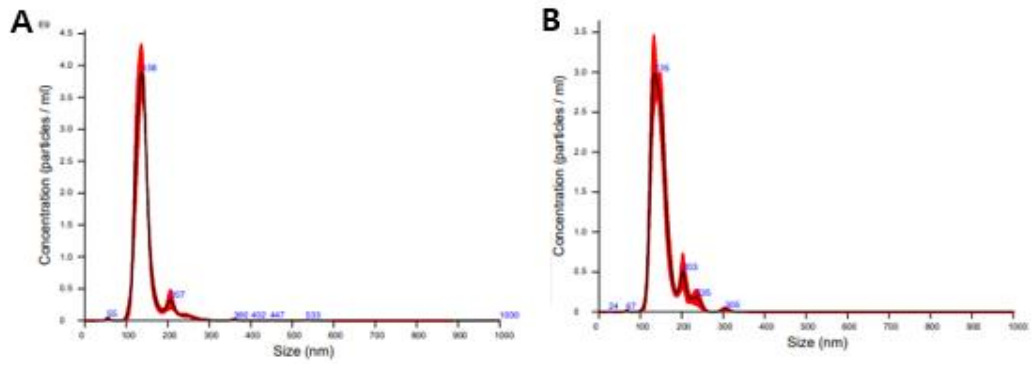


Figure 3. 엑소좀과 형광표지된 엑소좀의 NTA 측정 (A) 엑소좀의 NTA 그래프, (B) 형광표지된 엑소좀의 NTA 그래프

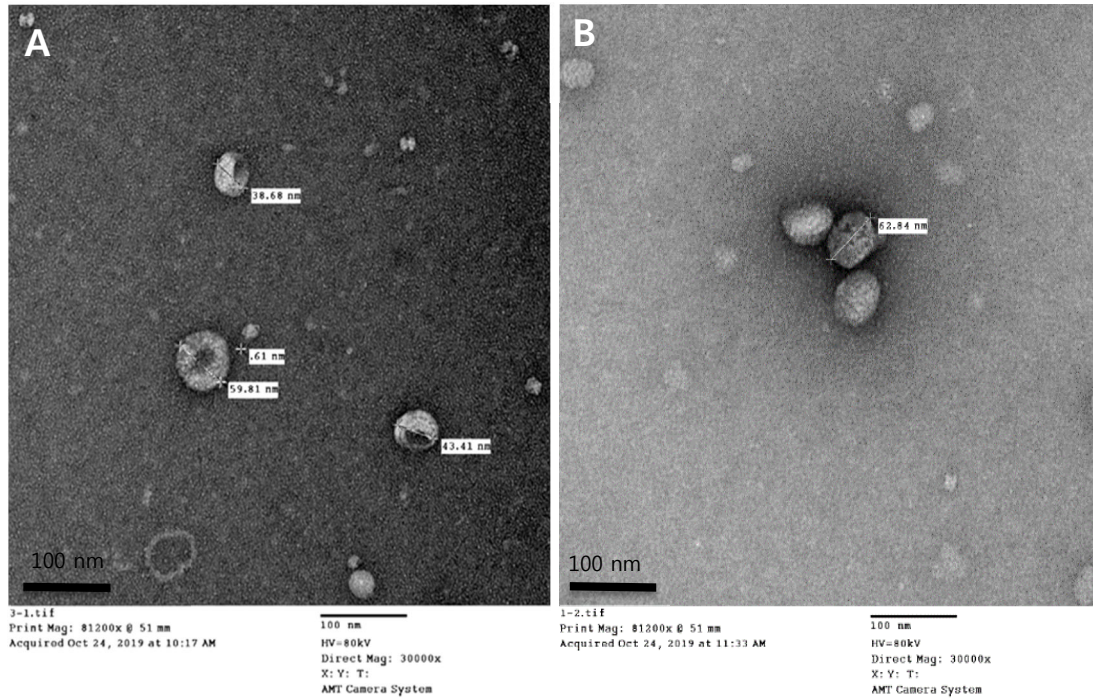


Figure 4. TEM 이미지 촬영 (A) 엑소좀의 TEM 이미지, (B) 형광 표지된 엑소좀의 TEM 이미지

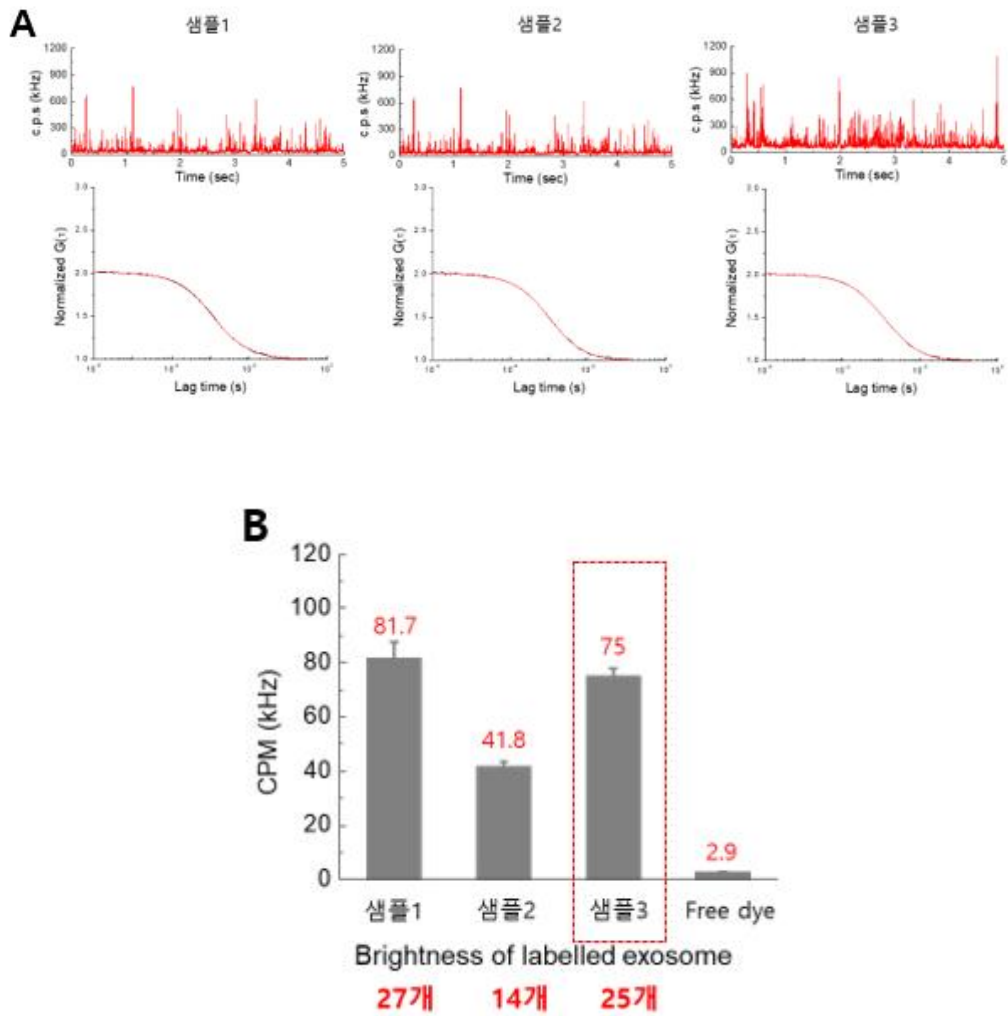


Figure 5. FCS를 통한 형광표지 효율 측정 (A)FCS raw data와, 형광 상관 함수 그래프 (B) 엑소좀 1개당 표지된 염료 수 그래프

실시간 세포이미징을 통한 형광 표지된 엑소좀의 기능 분석

형광 표지된 엑소좀의 물리화학적 특성을 분석하였고 구조 변형이 없음을 확인하였다. 형광 표지된 엑소좀이 세포 반응에 영향을 보기 위해서 live cell 이미징 기술을 적용하였다. Live cell 이미징을 통해 Raw 264.7 cell에서 시간이 지남에 따라 형광 표지된 엑소좀이 세포 외에서 세포 내로 이동이 증가함을 알 수 있었다. 형광 표지로 인해 엑소좀의 세포내로의 이동하는 기능이 줄지 않음을 확인하였다. 따라서 기존 형광 염색법에 비해 본 연구를 통해 개발된 표지법이 물리적인 영향이 적으며 기능에 영향을 미치지 않음을 동정하였다. 본 표지법을 이용하여 소동물 모델에 적용을 하는 방법으로 사용하였다.

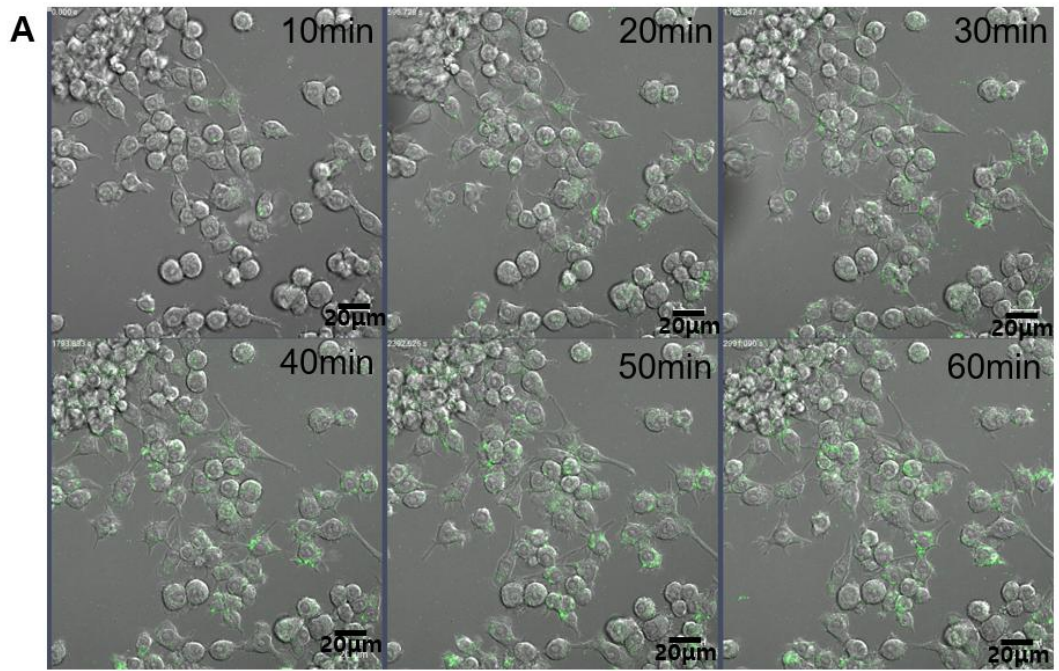


Figure 6. 4D 실시간 세포 이미징 (A) 형광 표지 엑소좀의 이동 관찰

형광 표지된 엑소좀의 직진성 및 검출 한계 검증

정량으로 물리화학적 특징이 검증된 형광 표지 엑소좀을 이용하여 직진성을 검증하였다. IVIS spectrum으로 E-tube에서 형광 표지된 엑소좀의 농도가 증가함에 따라 영상신호의 강도가 증가함을 확인하였으며 측정값을 정비례 그래프로 나타내 R^2 값이 0.98로 1에 근접하여 직진성을 확인하였다(Table 2-A, Figure 7-A). BALB/c-nu 마우스의 피하에 형광 표지된 엑소좀을 투여하여 엑소좀의 농도가 증가함에 따라 영상신호의 강도가 증가함을 확인하였으며 측정값을 정비례 그래프로 나타내 R^2 값이 0.99로 1에 근접하여 직진성을 확인하였다 (Table 2-B, Figure 7-B).

제시된 시험법의 검출한계를 알아보기 위해 표지된 엑소좀을 5개 구간으로 나누어 투여하고 즉각적으로 분석하였다. 마우스를 마취시키고 Stereotactic frame에 머리를 고정시킨 후 두피를 절개하고 다양한 깊이와 농도로 주입을 하였다. 본 검사법을 이용하여 소량의 표지된 엑소좀을 투여하여 광학영상 검출한계 이하 농도만이 투여되어 반복 시험 결과 고농도의 표지 엑소좀이 필요하였다.

조직의 깊이에 따른 생체내 분포 평가를 수행하기 위해 마우스를 마취시키고 Stereotactic frame에 머리를 고정시킨 후 두피를 절개하고 다양한 깊이와 농도로 주입을 하였다. 주입 양이 극소량으로 주입이 됨으로 형광표지된 엑소좀이 고농도로 필요하였으며 2.5mm 깊이에서 신호를 보였으며 그 이상의 깊이에서는 관찰이 쉽지 않았다.

광학영상은 이론적으로 근적외선 영역인 650nm-780nm 파장에서 관찰 시 1cm이내에서만 신호를 보이는 검출한계가 있다. 이러한 경우는 농도가 높을 경우이며 엑소좀의 경우는 고농도로 적용하기가 힘들므로 조직의 깊이에 따른 생체내 분포 평가에 한계를 보였다 (Figure 8).

Table 2. IVIS spectrum 측정 (A) E-tube에서의 농도별 IVIS spectrum 측정값, (B) BALB/c-nu 마우스의 피하에의 농도별 IVIS spectrum 측정값

A					
Particles/ml	3×10⁹	1.5×10⁹	6×10⁸	3×10⁸	3×10⁷
<u>희석배수</u>	1	1/2	1/3	1/10	1/100
Particles	1.50E+08	7.50E+07	3.00E+07	1.50E+07	1.50E+06
Intensity	3.16E+08	1.62E+08	8.19E+07	6.47E+07	6.41E+07

B					
Particles/ml	3×10⁹	1.5×10⁹	6×10⁸	3×10⁸	3×10⁷
<u>희석배수</u>	1	1/2	1/3	1/10	1/100
Mouse 1	4.12E+08	2.06E+08	1.33E+08	9.97E+07	8.14E+07
Mouse 2	4.43E+08	2.13E+08	1.31E+08	1.01E+08	8.25E+07
Mouse 3	4.09E+08	2.32E+08	4.45E+08	1.01E+08	8.37E+07
평균	4.21E+08	2.17E+08	1.36E+08	1.01E+08	8.25E+07

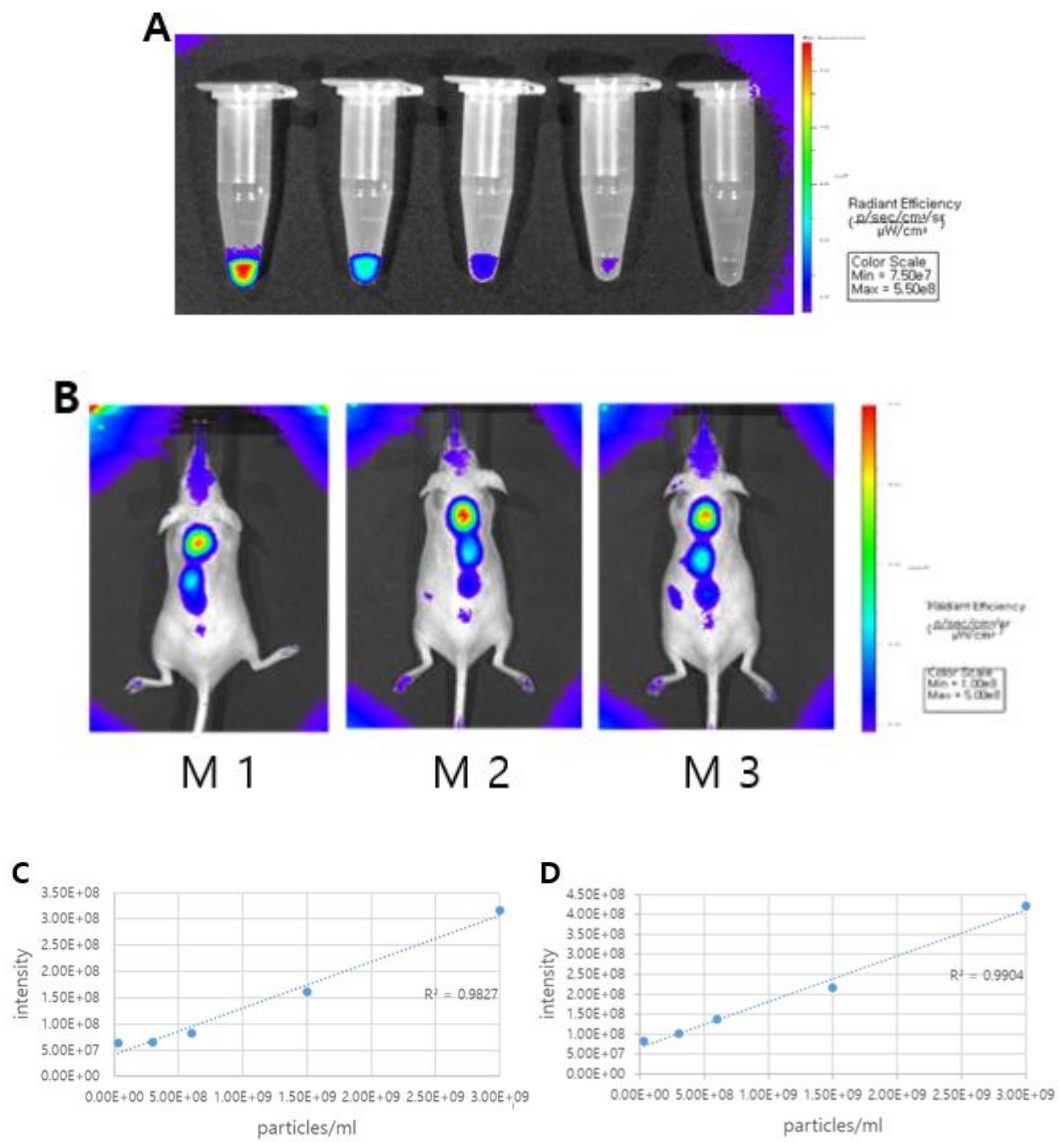


Figure 7. IVIS spectrum 측정 (A) E-tube에서의 농도별 IVIS spectrum 이미지, (B) BALB/c-nu 마우스의 피하에의 농도별 IVIS spectrum 이미지

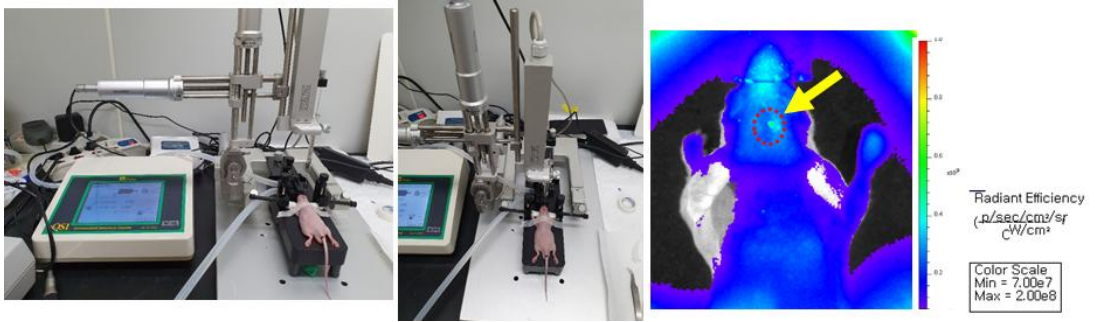


Figure 8. IVIS spectrum 측정 (A) BALB/c-nu 마우스의 피하에서 농도별 IVIS spectrum 이미지

형광 표지된 엑소좀의 생체 분포 평가

표지 염료와 엑소좀의 물리화학적 검증이 가능한 기법은 형광 표지임을 알 수 있었다. 따라서 최종적으로 광학영상 기법을 본 과제에 최적 이미징 기법으로 선정하였다. 광학영상을 이용한 시험평가법을 개발하기 위해 꼬리 정맥에 표지된 엑소좀을 투여하여 최적 영상을 위한 시간을 선정하였으며 장기의 농도를 검출하기 위한 방법을 도출하기 위해 장기 추출 후 영상을 촬영함.

형광표지된 엑소좀의 생체분포를 확인하기 위해 BALB/C-nu 마우스의 정맥에 1×10^9 particle/200 μ L을 주사하여 투여 전, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간 IVIS spectrum 이미징을 수행하였다. In vivo 이미징 결과 간에서의 신호가 큰 것을 확인하였다(Fig. 9-A). IVIS spectrum은 형광으로 깊은 조직의 이미징이 힘들기 때문에 시간별 간, 비장, 신장, 폐, 심장, 췌장, 위, 소장, 대장을 추출하여 형광 신호를 측정 한 결과 In vivo 이미징과 같이 간에서 가장 강한 신호를 나타냈으며, 간 이외 비장과 신장에서도 신호가 확인되었다(Fig. 9-B).

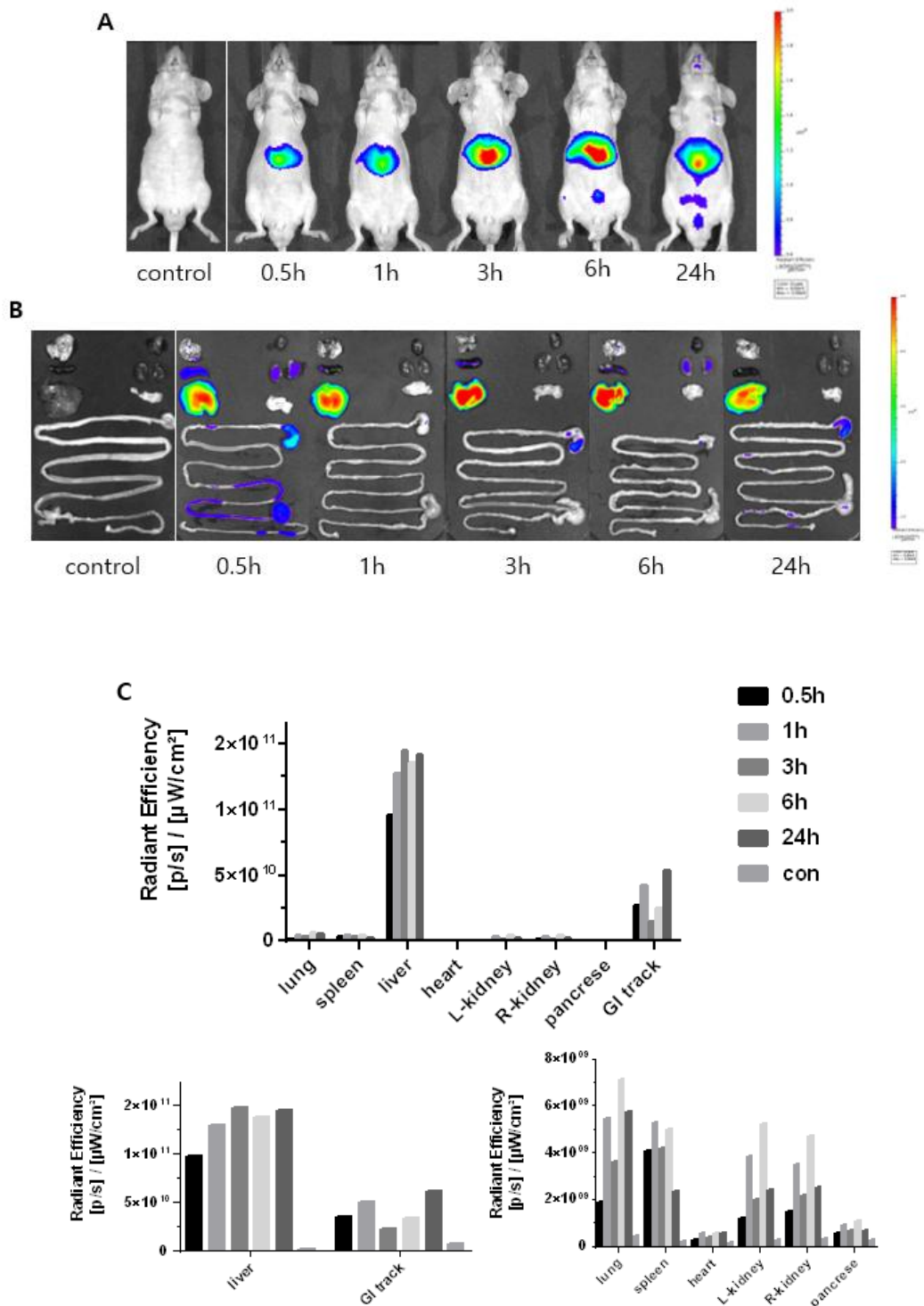


Figure 9. IVIS spectrum 측정(A) In vivo IVIS spectrum 이미지, (B) Ex vivo IVIS spectrum 이미지, (C) EX vivo IVIS spectrum 그래프

약물 투여법에 의한 생체 분포 평가법 검증

엑소좀을 표지를 하기위해 염료와 pH 조절을 통한 표지 효율 증가를 위한 sodium bicarbonate에 의해 희석이 되었다. 또한 표지 후 잔여 free dye를 제거하기 위한 desalting 과정을 통해 희석됨으로 표지후 고농도로 투여가 어려운 점이 있었다. 따라서 검증된 농축 방법으로 8배 농축을 시켜 최종 3×10^{10} 개/ml의 농도를 얻을 수 있었다. 이 농도로 약물 투여법에 의한 생체 분포 평가법 검증에 사용하였다.

정맥 투여 (IV injection) 후 시간별 in vivo 이미징 및 장기 추출 후 이미징. 투여 전, 30분, 1시간, 3시간, 6 시간 그리고 24시간 까지 in vivo 영상을 수행하였으며 시간별 장기를 추출하여 각각 영상을 획득하였다(Fig. 10-A). 24시간 이상은 참조 논문에서 표지된 물질의 유리 및 대사에 의한 영향으로 권장하지 않았으므로 24시간까지 분포를 수행하였다. 광학영상은 형광의 경우 깊은 조직의 이미징이 힘들기 때문에 시간별 장기 추출 후 생체 분포를 측정하여야 하였다. 장기 중 간에서 가장 강한 신호를 얻을 수 있었으며 6시간까지 증가를 하였으며 24시간에 감소함을 알 수 있었다.

위장관의 경우 2주전 무형광 사료로 교체를 하여 기존 사료에 발생하는 자가 형광을 최소화 하여야 하였다. 그러나 여전히 투여전 장기에서 위장과 대장에 형광 신호가 보였다. 광학영상을 이용하여 장기 분포를 시험 할 경우 장기 추출 후 소화기관을 PBS로 세척 후 관찰하여 자가 형광에 의한 artifact를 줄일 수 있을 것으로 사료되었다.

피하 주사 (SC injection) 후 후 시간별 in vivo 이미징 및 장기 추출 후 이미징을 하였다. 투여 전, 30분, 1시간, 3시간, 6 시간 그리고 24시간 까지 in vivo 영상을 수행하였으며 시간별 장기를 추출하여 각각 영상을 획득하였다(Fig. 10-C).

정맥투여와 달리 피하 투여 후 장기 분포는 상대적으로 늦게 분포됨을 알 수 있었고 약물의 분포 농도가 정맥 투여보다 낮음을 알 수 있었다. 투여 방법에 따라 약물 분포의 차이가 있음을 알 수 있었다.

생체내 분포 관찰을 위한 time point는 기존 참고 문헌을 통해 설정을 하였다. 참고 문헌에 따르면 24시간 이후 형광 신호가 대부분 감소를 하지만

채장에서 급격하게 높아짐으로 보고가 되었다. 이러한 결과는 잔여 세포의 소포치료제의 재 분포이거나 인위결과 (artefact) 일 것으로 사료되었다. 다른 참고 문헌에서는 혈중내 농도가 360분 이후에는 검출이 안되는 것으로 보고됨으로 종합적으로 형광 염료의 반감기가 길기 때문에 엑소솜에서 유리된 형광 염료의 비특이적 결합에 의한 신호임을 생각할 수 있었다. 따라서 24시간 이상에서 나오는 결과는 신빙성이 떨어 질 수 있으므로 24시간으로 설정하였다. 체내 반감기는 혈액 내에 농도는 6시간이내 임을 문헌 상 알 수 있었다. 이러한 자료를 기반으로 실험을 디자인하였고 수행을 하였다.

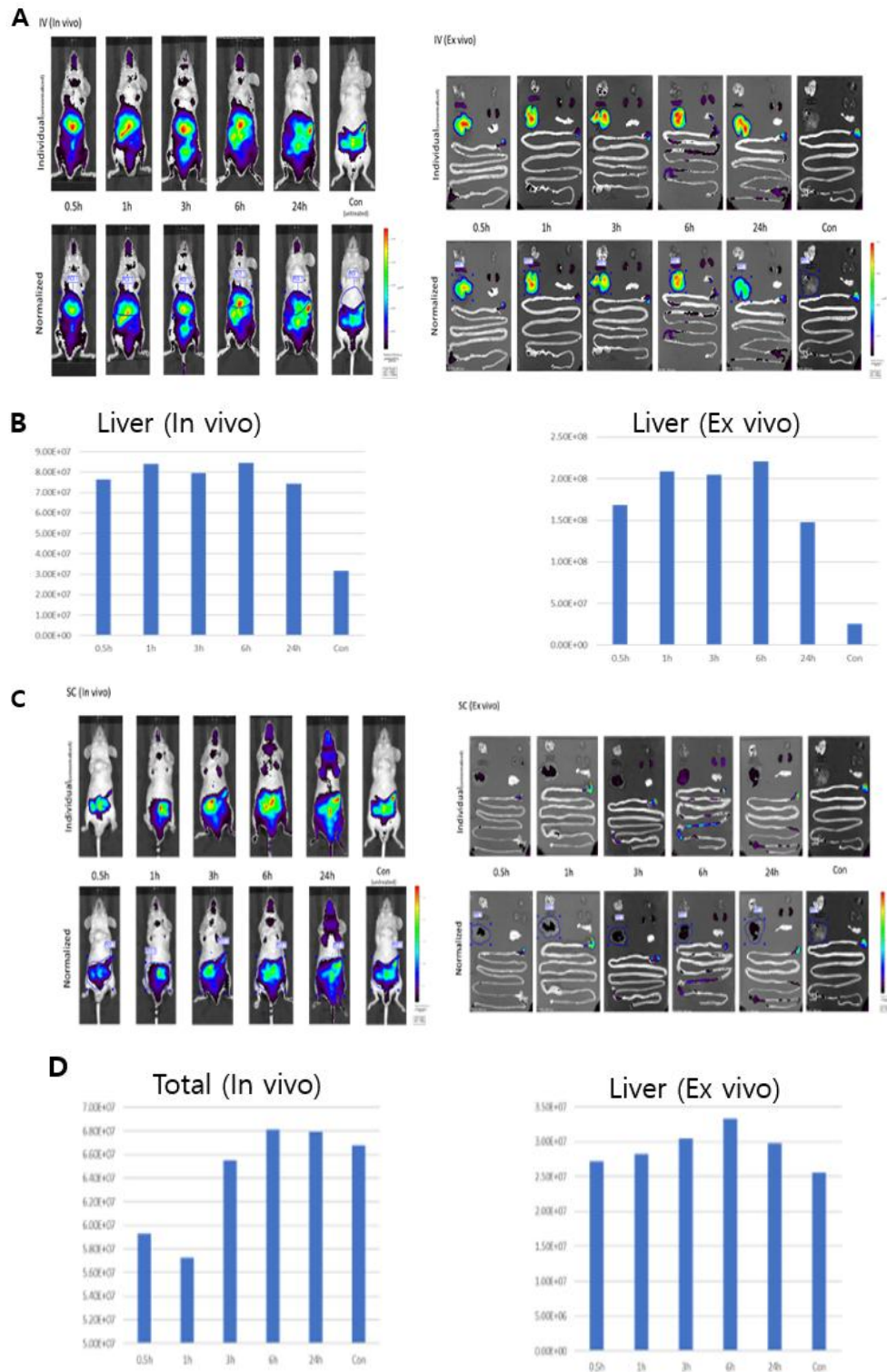


Figure 10. IVIS spectrum 측정(A) 정맥 투여 후 시간별 생체 분포, (B) 정맥 투여 후 간에서의 신호 그래프, (C) 피하 투여 후 시간별 생체 분포, (D) 피하 투여 후 간에서의 신호 그래프

결론 및 고찰

엑소솜은 모든 세포에서 분비하는 인지질 이중층 구조의 30~200nm의 크기를 가진 세포 외 소낭이다. 세포에서 분비되는 다른 소포인 미세소낭과 세포자멸소낭과 크기와 역할이 다른 것으로 알려져 있으며, 엑소솜은 생성과정을 통해 세포의 세포막 일부를 공유하게 되어 세포막 단백질을 갖고, 세포 외부로 분비되어 세포 간의 신호전달에 사용되는 것으로 알려져 있다. 엑소솜은 차세대 비세포 치료제나 바이오마커로 연구되고 있다. 그러나 엑소솜은 크기가 작아 표적 장기 외 정상 조직이나 세포에 흡수될 수 있어 엑소솜의 개발과정에서 엑소솜의 생체분포평가가 필요하다.

본 연구는 엑소솜의 생체분포평가를 위해 최적의 엑소솜 표지방법을 찾았다. 기존 엑소솜의 표지의 단점인 엑소솜의 기능이나 특성에 영향을 주거나 시간이 지날수록 프로브가 엑소솜에서 떨어져 분리된 프로브로 인해 배경 신호가 나타나는 것을 보완하는 표지법을 통해 엑소솜을 표지한 후 엑소솜의 물리적 특성에 변화가 없음을 검증하였다. NTA와 TEM 이미징을 통해 엑소솜과 형광 표지된 엑소솜의 외형 손상이 거의 없음을 확인하였으며, FCS측정으로 형광물질 특성분석을 통해 형광염료와 표지된 엑소솜이 분리가 잘 됨을 확인하였으며 엑소솜 한 개당 표지 염료의 개수를 확인하였다. 4D 실시간 세포 이미징을 통해 형광 표지된 엑소솜의 이동성이 줄어들지 않음을 확인하였다.

표지된 엑소솜을 통해 생체 분포시험 연구를 시행하였으며 꼬리 정맥에 표지된 엑소솜을 주입한 mouse의 광학영상 *in vivo*와 *ex vivo* 이미징 결과 대부분이 간으로 이행되었으며, 비장과 위장관에도 축적된 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 1) Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.
- 2) Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73(10), 1907-1920.
- 3) Kanada, M., Bachmann, M. H., & Contag, C. H. (2016). Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends in cancer*, 2(2), 84-94.
- 4) H. Rashed, M., Bayraktar, E., K. Helal, G., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 538.
- 5) Van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4), 213-228.
- 6) Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- 7) Lee, Y., El Andaloussi, S., & Wood, M. J. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human molecular genetics*, 21(R1), R125-R134.
- 8) Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.
- 9) El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 347-357.
- 10) Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12(12), 1659-1668.
- 11) Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 110(1), 13-21.
- 12) Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles.

Pharmacological reviews, 64(3), 676-705

- 13) Properzi, F., Logozzi, M., & Fais, S. (2013). Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomarkers in medicine*, 7(5), 769-778.
- 14) Li, Y., Yin, Z., Fan, J., Zhang, S., & Yang, W. (2019). The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 4(1), 1-12.
- 15) Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X. M., ... & Wang, X. Z. (2015). Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *The scientific world journal*, 2015.
- 16) Wong, C. H., & Chen, Y. C. (2019). Clinical significance of exosomes as potential biomarkers in cancer. *World journal of clinical cases*, 7(2), 171.
- 17) Chen, C., Zong, S., Liu, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Chen, B., & Cui, Y. (2019). Profiling of Exosomal Biomarkers for Accurate Cancer Identification: Combining DNA PAINT with Machine Learning Based Classification. *Small*, 15(43), 1901014.
- 18) Lakshmi, S., Essa, M. M., Hartman, R. E., Guillemin, G. J., Sivan, S., & Elumalai, P. (2020). Exosomes in Alzheimer's disease: Potential role as pathological mediators, biomarkers and therapeutic targets. *Neurochemical Research*, 45(11), 2553-2559.
- 19) Sheller-Miller, S., Radnaa, E., Yoo, J. K., Choi, K., Kim, Y., Kim, Y. N., ... & Menon, R. (2021). Exosomal delivery of NF- κ B inhibitor delays LPS-induced preterm birth and modulates fetal immune cell profile in mouse models. *Science Advances*, 7(4), eabd3865.
- 20) Tucci, M., Mannavola, F., Passarelli, A., Stucci, L. S., Cives, M., & Silvestris, F. (2018). Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget*, 9(29), 20826.
- 21) Yi, Y. W., Lee, J. H., Kim, S. Y., Pack, C. G., Ha, D. H., Park, S. R., ... & Cho, B. S. (2020). Advances in analysis of biodistribution of exosomes by molecular imaging. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 665.
- 22) Willmann, J. K., Van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., & Gambhir, S. S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nature reviews Drug discovery*, 7(7), 591-607.
- 23) Gangadaran, P., Li, X. J., Lee, H. W., Oh, J. M., Kalimuthu, S., Rajendran, R. L., ... & Ahn, B. C. (2017). A new bioluminescent reporter system to study the biodistribution

- of systematically injected tumor-derived bioluminescent extracellular vesicles in mice. *Oncotarget*, 8(66), 109894
- 24) Zhu, X., Badawi, M., Pomeroy, S., Sutaria, D. S., Xie, Z., Baek, A., ... & Phelps, M. A. (2017). Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *Journal of extracellular vesicles*, 6(1), 1324730.
- 25) Boltze, J., Arnold, A., Walczak, P., Jolkkonen, J., Cui, L., & Wagner, D. C. (2015). The dark side of the force—constraints and complications of cell therapies for stroke. *Frontiers in neurology*, 6, 155.
- 26) Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., & Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & molecular medicine*, 49(6), e346-e346.
- 27) Cho, B. S., Kim, J. O., Ha, D. H., & Yi, Y. W. (2018). Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-5.
- 28) Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K. M., Wu, C. C., Gagea, M., ... & Kalluri, R. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI insight*, 3(8).
- 29) Wiklander, O. P., Bostancioglu, R. B., Welsh, J. A., Zickler, A. M., Murke, F., Corso, G., ... & Görgens, A. (2018). Systematic methodological evaluation of a multiplex bead-based flow cytometry assay for detection of extracellular vesicle surface signatures. *Frontiers in immunology*, 1326.
- 30) Lai, R. C., Tan, S. S., Teh, B. J., Sze, S. K., Arslan, F., De Kleijn, D. P., ... & Lim, S. K. (2012). Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *International journal of proteomics*, 2012.
- 31) Royo, F., Cossío, U., de Angulo, A. R., Llop, J., & Falcon-Perez, J. M. (2019). Modification of the glycosylation of extracellular vesicles alters their biodistribution in mice. *Nanoscale*, 11(4), 1531-1537.
- 32) Nagyova, M., Slovinska, L., Blasko, J., Grulova, I., Kuricova, M., Cigankova, V., ...

- & Cizkova, D. (2014). A comparative study of PKH67, DiI, and BrdU labeling techniques for tracing rat mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 50(7), 656-663.
- 33) Horan, P. K., & Slezak, S. E. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature*, 340(6229), 167-168.
- 34) Kuffler, D. P. (1990). Long term survival and sprouting in culture by motoneurons isolated from the spinal cord of adult frogs. *Journal of comparative neurology*, 302(4), 729-738.
- 35) Morales-Kastresana, A., Telford, B., Musich, T. A., McKinnon, K., Clayborne, C., Braig, Z., ... & Jones, J. C. (2017). Labeling extracellular vesicles for nanoscale flow cytometry. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- 36) Jung, K. O., Jo, H., Yu, J. H., Gambhir, S. S., & Pratz, G. (2018). Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes. *Biomaterials*, 177, 139-148.
- 37) Lee, H., Park, H., Noh, G. J., & Lee, E. S. (2018). pH-responsive hyaluronate-anchored extracellular vesicles to promote tumor-targeted drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 202, 323-333.
- 38) Betzer, O., Perets, N., Angel, A., Motiei, M., Sadan, T., Yadid, G., ... & Popovtzer, R. (2017). In vivo neuroimaging of exosomes using gold nanoparticles. *ACS nano*, 11(11), 10883-10893.
- 39) Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., ... & Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329-335.
- 40) Zhang, X., Bloch, S., Akers, W., & Achilefu, S. (2012). Near infrared molecular probes for in vivo imaging. *Current protocols in cytometry*, 60(1), 12-27.
- 41) Kanada, M., Bachmann, M. H., & Contag, C. H. (2016). Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends in cancer*, 2(2), 84-94.
- 42) Grange, C., Tapparo, M., Bruno, S., Chatterjee, D., Quesenberry, P. J., Tetta, C., & Camussi, G. (2014). Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *International*

- journal of molecular medicine*, 33(5), 1055-1063.
- 43) Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., ... & Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390.
 - 44) Boddington, S., Henning, T. D., Sutton, E. J., & Daldrup-Link, H. E. (2008). Labeling stem cells with fluorescent dyes for non-invasive detection with optical imaging. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (14), e686.
 - 45) Lázaro-Ibáñez, E., Faruqu, F. N., Saleh, A. F., Silva, A. M., Tzu-Wen Wang, J., Rak, J., ... & Dekker, N. (2021). Selection of fluorescent, bioluminescent, and radioactive tracers to accurately reflect extracellular vesicle biodistribution in vivo. *ACS nano*, 15(2), 3212-3227.
 - 46) Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., ... & Andaloussi, S. E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 26316.
 - 47) Jang, S. C., Kim, S. R., Yoon, Y. J., Park, K. S., Kim, J. H., Lee, J., ... & Gho, Y. S. (2015). In vivo kinetic biodistribution of nano sized outer membrane vesicles derived from bacteria. *Small*, 11(4), 456-461.
 - 48) Lai, C. P., Mardini, O., Ericsson, M., Prabhakar, S., Maguire, C. A., Chen, J. W., ... & Breakefield, X. O. (2014). Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS nano*, 8(1), 483-494.
 - 49) Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith-Jones, P., Graner, M. W., & Anchordoquy, T. J. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release*, 199, 145-155.
 - 50) Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., ... & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 780-788.

Development of Biodistribution Evaluation of Exosomes

Mi Yeon Kim

Graduate school, University of Ulsan college of Medical Science

(Supervised by Professor Jeong Kon Kim)

(Abstract)

Exosomes are nano-sized information carriers secreted by all cells. The membrane is a lipid bilayer and contains abundant biological information such as mRNA and miRNA. Exosomes have recently been studied a lot as biomarkers and cell free therapy. Since these exosomes are small in size and absorbed by various organs in the body, they can reach other organs as well as desired organs and be absorbed by tissues and cells, so an in vivo distribution experiment is required as a prerequisite for drug development.

Optical imaging, which can image distribution in vivo, is non-invasive and can be repeatedly measured, minimizing the experimental period and development cost. In order to analyze the biodistribution of exosomes with an optical image, an appropriate probe marker is required for image analysis of exosomes. However, the existing labeling method of exosomes has the disadvantage of affecting the function or characteristics of exosomes, or background signals may appear due to probes separated from exosomes over time. To compensate for this, it is necessary to study the biodistribution test considering the route of administration after labeling exosomes through fluorescence labeling using covalent bonds.

in this study, the presence or absence of structural change and fluorescence labeling efficiency of fluorescently labeled exosomes were verified to establish the fluorescence labeling method, and the biodistribution over time was confirmed through optical images.