

DDS 기술을 응용한 인체줄기세포 유래 엑소좀과 리포좀을 융합한 화장품 원료의 주름 개선 효과

DDS 技術を応用しヒト幹細胞由来エクソソームとリポソームをハイブリッドした化粧品原料のシワ改善効果
Wrinkle improvement effect of cosmetic ingredients made by hybridizing exosome and
liposome derived from human stem cells using DDS Technology

Lee Dong Hee, 藤田英人(후지타 히데오, Hideto Fujita)

1. 서론

인체줄기세포배양액에는 다양한 기능성이 기대되고 있는데 그 하나가 주름의 개선이다. 인체줄기세포 배양액은 EGF나 FGF 등 성장인자를 함유하고 있으며 그것들이 리간드가 되어 세포의 리셉터에 결합함으로써 콜라겐이나 히알루론산 등 세포외기질의 생성 촉진과 세포증식을 촉진함으로써 턴오버를 촉진하고 주름의 개선에 공헌하고 있다고 생각된다.

최근 인체줄기세포배양액 성분으로서 엑소좀이 주목을 받고 있다. 당사에서는 인체줄기세포배양액에서 엑소좀을 분리해 다양한 기능성 검증을 실시했으며 그 결과, 인체줄기세포배양액이 가진 기능의 많은 부분을 엑소좀 단독으로도 갖고 있음이 확인됐다. 특수한 출발 배지나 배양법에 의해 당사의 인체줄기세포배양액은 엑소좀을 많이 함유하고 있으며 인체줄기세포배양액의 기능성에서 엑소좀은 중요한 역할을 담당하고 있다고 생각하고 있다. 또한 엑소좀은 화장품 뿐만 아니라 의료영역에서도 활발하게 연구가 진행되고 있다.

당사의 하이브리드 엑소좀은 기존 인체줄기세포배양액 리포좀과 줄기세포가 분비한 엑소좀을 융합한 화장품 원료로 의료영역의 Drug Delivery 연구에 의한 기술을 응용한 것이다. 이 하이브리드 엑소좀으로 주름에 대한 효과를 검증해 양호한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

2. 엑소좀

엑소좀은 50~150nm 정도의 세포가 분비되는 소포 extracellular vesicle(EV)의 하나로 80년대에 발견된 이래로 오랫동안 세포 내의 불필요한 물질의 폐기수단이 큰바 ‘세포의 쓰레기통’이라고 생각되어 왔지만 2007년에 내포되어 있는 miRNA가 레시피엔트 세포의 기능 제어에 관여하고 있는 것이 보고되어 최근에는 세포와 세포 사이를 연결하는 커뮤니케이션 수단 즉 ‘정보 캡슐’로서의 연구가 진행되고 있다¹⁾.

그 정보를 해석하는 것으로 질병의 진단에 활용하려는 목적이나 엑소좀 자체를 치료 도구로 사용하기 위한 연구도 진행되고 있다. 예를 들어 간염계 줄기세포가 분비하는 엑소좀에는 창상 치유와 관련된 정보가 많이 포함되어 있는 것이 보고도 있었다²⁾. 이러한 기능은 화장품의 용도로도 활발히 연구하고 있으며 엑소좀은 도포한 후 피부에 침투해 콜라겐이나 엘라스틴의 합성을 촉진하는 것이 확인됐다³⁾.

2-1. 엑소좀을 분비시키는 줄기세포 배양

줄기세포에서 분비되는 엑소좀은 배양된 줄기세포가 과밀해지면 양이 저하되고 세포의 계대가 진행되면 활성이 저하된다. 또한 배양액 중에서 빈번하게 엑소좀을 회수하면 분비량이 증가한다⁴⁾. 2차원 배양과 3차원 배양으로 비교하면 3차원 배양에서 배양된 줄기세포 유

DDS 技術を応用しヒト幹細胞由来エクソソームとリポソームを ハイブリッドした化粧品原料のシワ改善効果

Lee Dong Hee 藤田英人

1.はじめに

ヒト幹細胞培養液には様々な機能性が期待されているが、その一つがシワの改善である。ヒト幹細胞培養液は EGF や FGF など成長因子を含有しており、それらがリガンドとなって細胞のレセプタに結合することで、コラーゲンやヒアルロン酸など細胞外マトリックスの生成促進や、細胞増殖を促すことでターンオーバーを促進し、シワの改善に貢献していると考えられている。

近年、ヒト幹細胞培養液の成分としてエクソソームが注目を集めている。弊社が行なった実験では、ヒト幹細胞培養液からエクソソームを分離しさまざまな機能性の検証を行うと、ヒト幹細胞培養液の持つ機能の多くをエクソソーム単独でも持っていることが確認されている。特殊な出発培地や培養法により、弊社のヒト幹細胞培養液はエクソソームを多く含有していることもあり、ヒト幹細胞培養液の機能性において、エクソソームは重要な役割を担っていると考えている。

また、エクソソームは化粧品のみならず、医療領域でも盛んに研究が行われている。弊社のハイブリッドエクソソームは従来のヒト幹細胞培養液のリポソームと幹細胞が分泌したエクソソームを融合した化粧品原料で、医療領域のドラッグデリバリーの研究から技術に応用したもの。このハイブリッドエクソソームによって、シワに対する効果を検証し、良好な結果を得たので報告する

2.エクソソーム

エクソソームは 50~150nm ほどの細胞が分泌する小胞 extracellular vesicle: EV の一つで、80 年代に発見されて以来、長い間細胞内の不要な物質の廃棄手段いわゆる“細胞のゴミ袋”と考えられてきたが、2007 年に内包されている miRNA がレシピエント細胞の機能制御に関与していることが報告され、近年では細胞と細胞の間を繋ぐコミュニケーション手段、つまり“情報カプセル”としての研究が進んでいる 1)。その情報を読み解くことで疾病の診断に活用しようとする目的や、エクソソーム自体を治療のツールに用いるための研究も行われている。例えば間葉系幹細胞が分泌するエクソソームには、創傷治癒に関連する情報が多く含まれていることが報告されている 2)。こうした機能は化粧品の用途としても盛んに研究が行われており、エクソソームは塗布した後皮膚に浸透し、コラーゲンやエラスチンの合成を促進することが示唆されている 3)。

2-1.エクソソームを分泌させる幹細胞の培養

幹細胞から分泌されるエクソソームは、培養される幹細胞が過密になると量が低下し、細胞の継代が進むと活性が低下する。また培養液中から頻繁にエクソソームを回収すると分泌量が増加する 4)。2次元培養と3次元培養で比較すると、3次元培養で培養された幹細胞由来のエクソソームの方がラットの外傷性脳損傷に対しての機能を大幅に回復させた 5)。

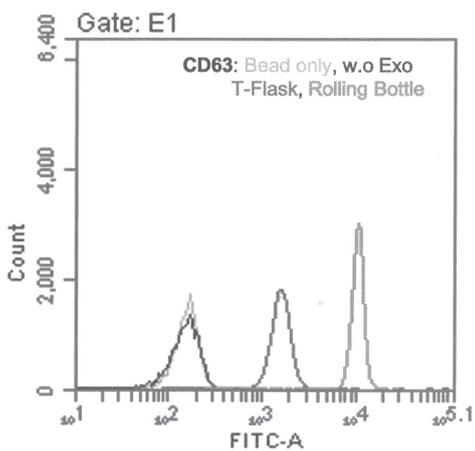


그림1 항CD63항체에 의해 엑소좀의 마커 단백질 CD63을 정량 일반적인 플라스크에 의한 배양과 비교해 롤러 보틀에 의한 배양에서는 10배의 CD63가 측정됐다.

래의 엑소좀이 랫(rat)의 외상성 뇌 손상에 대한 기능을 대폭 회복시켰다⁵⁾. 이와 같이 줄기세포의 상태나 배양하는 방법에 따라 엑소좀의 수량과 활성은 변화한다.

당사는 DMEM 배지에 독자적인 개량을 더한 특수출발 배지를 이용해 줄기세포에는 그다지 사용되지 않는 롤러 보틀 배양을 통해 인체줄기세포배양액을 제조하고 있다. 롤러 보틀 배양의 최대 장점은 회전하는 것이 줄기세포에 대한 자극이 되어 사이토카인이나 엑소좀의 분비량이 증가한다는 것이다. 줄기세포의 수와 배양 기간 등 조건을 갖추어 롤러 보틀과 일반적으로 사용되는 플라스크를 통한 배양으로 엑소좀의 분비량을 비교했다.

엑소좀에 특유의 마커 단백질 CD63을 FITC(fluoresce in isothiocyanate)에 의해 표시한 항CD63 항체를 이용하여 FACS(Fluorescence activated cell sorting) 분석에 의해 정량하면 롤러 보틀에서는 엑소좀의 양이 약 10배가 됐다(그림1). 또한 당사의 출발 배지와 DMEM을 이용해 같은 롤러 보틀에서 배양해 비교하면 당사의 배지에서는 엑소좀 함유량이 30배라는 결과를 얻었다.

롤러 보틀이나 자체 배지를 통한 배양 뿐만 아니라 성장인자의 분비량을 향상시키기 위해 저산소상태로 만드는 등 생체를 모방한 자극도 실시하고 있다⁶⁾.

2-2. 엑소좀의 *in vitro* 데이터

배양으로 얻은 엑소좀을 분리해 섬유아세포의 증

식이나 콜라겐의 생성, 케라티노사이트의 증식이나 유주 등에 대해 *in vitro*로 시험을 했으며 그 결과는 Fragrance Journal 2020년 1월호에 게재했으므로 여기서는 생략하지만 모두 양호한 결과를 얻었다. 단순 비교는 할 수 없으나 이 결과들은 다양한 성장인자를 함유하는 인체줄기세포배양액 'RemyStem'과 동일한 내용이며 당사는 이 결과를 바탕으로 엑소좀이 인체줄기세포배양액의 중요한 구성 성분이라고 생각하고 있다.

또한 인체줄기세포배양액에는 없는 엑소좀의 자체 효과도 검증되고 있다. 인체 섬유아세포에 자외선을 조사해 인위적으로 광 노화 상태를 유도하고 엑소좀을 첨가하면 섬유아세포가 분비되는 마커 SA-β-갈락토시다아제의 발현이 감소하고 형질도 정상 상태로 돌아와 세포분열을 재개한다.

한편, 엑소좀에 함유되어 있는 miRNA를 저해하면 SA-β-갈락토시다아제의 감소는 관찰되지 않았다. 이 결과로부터 광 노화된 섬유아세포의 기능을 회복시킨 것은 엑소좀에 내포되어 있는 miRNA의 영향인 것이 확인됐다. 당사의 배양조건에 따라 줄기세포가 분비되는 엑소좀에는 이러한 효과들이 있다는 것이 확인됐다.

3. 인체줄기세포배양액의 침투

인체줄기세포배양액은 섬유아세포의 증식을 촉진, 세포외기질 생성, 피부 탄력성 등을 개선하는 것은 잘 알려져 있으며 거기에 관여하는 사이토카인은 EGF, bFGF, TGF-β, VEGF 등이다⁷⁾. 단 일반적으로는 500Da를 넘는 분자는 쉽게 침투되지 않으므로 친유성 성분에 의한 수식이나 마이크로니들링, 일렉트로포레이션, 플렉서널 레이저 등에 의한 침입 경로의 확보가 필요하다. 당사의 인체줄기세포배양액은 발매 이래로 화장품 용도로는 리포솜을 추천해왔다.

3-1. 리포솜

리포솜은 나노 스케일의 지질 이중막 구조를 가진 소포로 사람의 세포막 구조를 본뜬 것이다. 최근 주목을 받는 DDS(Drug Delivery System) 중 하나이다. 리포솜의 조제에는 초음파처리, 익스트루더, 에탄올 주입법,

이와 같이 줄기세포의 상태나 배양하는 방법에 따라 엑소좀의 수량과 활성은 변화한다.

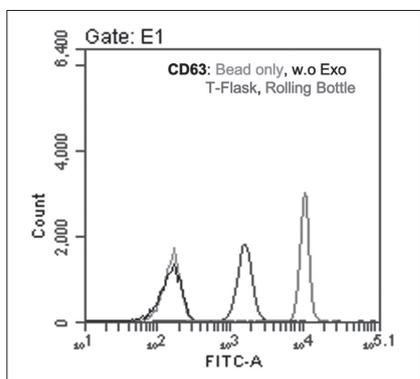
당사는 DMEM 배지에 독자적인 개량을 더한 특수출발 배지를 이용해 줄기세포에는 그다지 사용되지 않는 롤러 보틀 배양을 통해 인체줄기세포배양액을 제조하고 있다. 롤러 보틀 배양의 최대 장점은 회전하는 것이 줄기세포에 대한 자극이 되어 사이토카인이나 엑소좀의 분비량이 증가한다는 것이다. 줄기세포의 수와 배양 기간 등 조건을 갖추어 롤러 보틀과 일반적으로 사용되는 플라스크를 통한 배양으로 엑소좀의 분비량을 비교했다.

엑소좀에 특유의 마커 단백질 CD63을 FITC(fluoresce in isothiocyanate)에 의해 표시한 항CD63 항체를 이용하여 FACS(Fluorescence activated cell sorting) 분석에 의해 정량하면 롤러 보틀에서는 엑소좀의 양이 약 10배가 됐다(그림1). 또한 당사의 출발 배지와 DMEM을 이용해 같은 롤러 보틀에서 배양해 비교하면 당사의 배지에서는 엑소좀 함유량이 30배라는 결과를 얻었다.

롤러 보틀이나 자체 배지를 통한 배양 뿐만 아니라 성장인자의 분비량을 향상시키기 위해 저산소상태로 만드는 등 생체를 모방한 자극도 실시하고 있다⁶⁾.

2-2. 엑소좀의 *in vitro* 데이터

배양으로 얻은 엑소좀을 분리해 섬유아세포의 증식이나 콜라겐의 생성, 케라티노사이트의 증식이나 유주 등에 대해 *in vitro*로 시험을 했으며 그 결과는 Fragrance Journal 2020년 1월호에 게재했으므로 여기서는 생략하지만 모두 양호한 결과를 얻었다. 단순 비교는 할 수 없으나 이 결과들은 다양한 성장인자를 함유하는 인체줄기세포배양액 'RemyStem'과 동일한 내용이며 당사는 이 결과를 바탕으로 엑소좀이 인체줄기세포배양액의 중요한 구성 성분이라고 생각하고 있다.



(그림1) 항CD63항체에 의해 엑소좀의 마커 단백질 CD63을 정량 일반적인 플라스크에 의한 배양과 비교해 롤러 보틀에 의한 배양에서는 10배의 CD63가 측정됐다.

하는 히트幹細胞培養液『RemyStem』と同等の内容であり、弊社はこの結果をもとにエクソソームがヒト幹細胞培養液における重要な構成成分であると考えている。

また、ヒト幹細胞培養液にはないエクソソーム独自の効果も検証されている。ヒト線維芽細胞に紫外線を照射し、人為的に光老化の状態を誘導し、エクソソームを添加すると、線維芽細胞が分泌する老化マーカー SA-β-ガラクトシダーゼの発現が減少し、形質も通常の状態に戻り、細胞分裂を再開する。一方でエクソソームに含有されているmiRNAを阻害すると、SA-β-ガラクトシダーゼの減少は観察されなかった。この結果から光老化した線維芽細胞を機能回復させたのはエクソソームに内包されているmiRNAによることが示唆された。弊社の培養条件によって幹細胞が分泌するエクソソームには、これらの効果があることが確認されている。

3. ヒト幹細胞培養液の浸透

ヒト幹細胞培養液が線維芽細胞の増殖を促進、細胞外マトリックスを生成、皮膚の弾力性を改善することはよく知られており、そこに関与しているサイトカインはEGF、bFGF、TGF-β、VEGFなどである7)。ただ、一般的には500Daを超える分子は容易に浸透しないので新油性成分による修飾や、マイクロニードリング、エレクトロポレーション、フラクショナルレーザーなどによる侵入経路の確保が必要になる。弊社のヒト幹細胞培養液は、上市以来、化粧品用途のものについてはリポソームを推奨してきた。

3-1. リポソーム

リポソームはナノスケールの脂質二重膜構造を持った小胞で、ヒトの細胞膜の構造を模したものである。近年注目を集めるDDSの一つである。リポソームの調整には超音波処理、エクストルーダー、エタノール注入法、逆相蒸発、超臨界流体技術など、いくつかの方法が知られているが8)、弊社のヒト幹細胞培養液は

역상 증발, 초임계 유체 기술 등 몇 가지 방법이 알려져 있지만⁸⁾ 당사의 인체줄기세포배양액은 마이크로 유체 디바이스를 사용해 지질 이중막을 형성하고 있다.

인체줄기세포배양액을 리포솜에 내포시켜도 기본적으로 사이즈는 변하지 않으나 생체적합성이 뛰어난 구조를 이루기 때문에⁹⁾ 피부에 침투하기 쉬워질 것으로 생각된다. 당사의 리포솜은 생체 내 이용률이 높은 100nm 전후로 조정되어 있다.

3-2. 하이브리드 엑소솜

당사의 하이브리드 엑소솜 'Remy EV-3'는 인체줄기세포배양액의 딜리버리를 향상시키기 위해 개발되었으며 인체줄기세포배양액의 리포솜과 줄기세포가 분비하는 엑소솜의 지질 이중막을 융합해 리포솜의 내포

물을 엑소솜의 내부에 충전한 화장품 원료(표1)이다. 엑소솜의 표면에 발현하고 있는 단백질에 의해 인체줄기세포배양액을 세포에 대한 선택적 흡입을 목적으로 한다. 엑소솜의 세포에 대한 흡입에는 불분명한 점도 많으며 엑소솜에서 발현되고 있는 테트라스파닌이 레시피엔트 세포의 선택에 기여한다는 보고도 있지만¹⁰⁾ 레시피엔트 세포 측의 흡입 능력에 의존하고 있다는 보고도 있다¹¹⁾.

엑소솜을 드럭 딜리버리의 캐리어로 사용하기 위해 엑소솜을 분비하는 세포를 수식(modification)하고 엑소솜의 기능을 개편해 치료에 활용하는 연구, 엑소솜에 직접 약제를 탑재시켜 DDS에 활용하는 연구 등이 이루어지고 있다¹²⁾. 이런 DDS 연구 중 하나가 하이브리드 엑소솜으로 'Remy EV-3'는 동결융해법¹³⁾ 등의

표1 Remy EV-3의 전성분

Ingredient	INCI name	한글성분명	CAS
RemyStem	Human Stem Cell Conditioned Media	인체줄기세포배양액	-
Defined Cell Culture Media 9	Defined Cell Culture Media 9	확정세포배양액9	-
Human Adipose Derived Mesenchymal Cell Exosomes	Human Adipose Derived Mesenchymal Cell Exosomes	인체지방유래중간엽세포배양엑소솜	-
Butylene Glycol	Butylene Glycol	부틸렌글라이콜	107-88-0
Water	Aqua	정제수	7732-18-5
Caprylic/Capric Triglyceride	Caprylic/Capric Triglyceride	카프릴릭/카프릭트라이글리세라이드	73398-61-5/ 65381-09-1
Hydrogenated Lecithin	Hydrogenated Lecithin	하이드로제네이티드레시틴	92128-87-5
1,2-Hexanediol	1,2-Hexanediol	1,2-헥산다이올	6920-22-5
Polysorbate 80	Polysorbate 80	폴리솔베이트80	9005-65-6
Caprylyl Glycol	Caprylyl Glycol	카프릴릴글라이콜	1117-86-8
Tocopheryl Acetate	Tocopheryl Acetate	토코페릴아세테이트	58-95-7

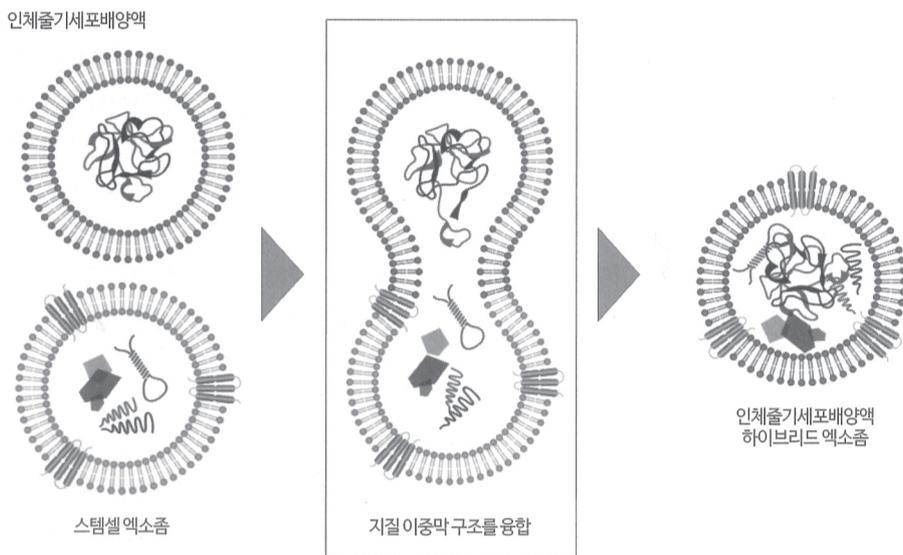


그림2 하이브리드 엑소솜의 개념

마이크로 유체 디바이스를 이용해 지질 이중막을 형성하고 있다. 히트幹細胞培養液을 리포솜에 내포시켜도 기본적으로 사이즈는 변하지 않으나, 생체 적합성에優れた構造となるため9)、皮膚に浸透しやすくなると考えられる。弊社のリポ솜は生体内利用率の高い100nm前後に調整されている。

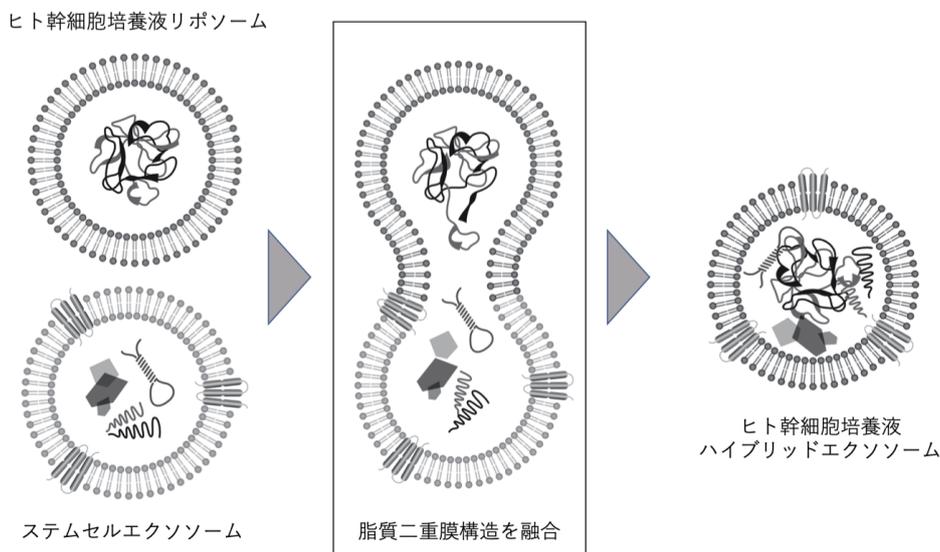
3-2. 하이브리드 엑소솜

弊社のハイブリッド 엑소솜『RemyEV-3』は、ヒト幹細胞培養液のデリバリーを向上させるために開発された化粧品原料である。ヒト幹細胞培養液のリポ솜と幹細胞が分泌する 엑소솜의 脂質二重膜を融合し、리포솜의 内包物を 엑소솜의 内部に充填した化粧品原料(圖2)。엑소솜의 表面에 発現している 단백질에 의해, 히트幹細胞培養液의 細胞への 選択적 取り込み를 目的としている。엑소솜의 細胞への 取り込みには 不明な点も多く、엑소솜에 発現している 테트라스파닌이 레시피엔트 細胞의 選擇에 寄与している

이라는 報告もあるが10)、レシピエン트 細胞側の 取り込み能力に 依存しているという 報告もある11)。 엑소솜을 ドラッグ デリ버리의 캐리어로 使用するための 手法としては、엑소솜을 分泌する 細胞를 修飾し 엑소솜의 功能을 改変し 治療에 活用する ような 研究、엑소솜에 直接 薬劑를 搭載させ DDS에 活用する 研究などが 行われている12)。 这样的 DDS 研究의 一つ가 하이브리드 엑소솜で、『RemyEV-3』는 凍結 融解法13) などの 技術을 応用して、大量生産に向いた 마이크로 유체 技術을 用いて 히트幹細胞培養液의 리포솜과 히트幹細胞의 엑소솜의 膜을 融合させている。この 操作を行う ことで、もともと 持っている 엑소솜의 表面의 단백질에 内部의 情報はそのままに、리포솜 中の 히트幹細胞培養液가 엑소솜에 内包される(圖3、4)。

Ingredient	INCI name	日本語成分名	CAS
RemyStem	Human Stem Cell Conditioned Media	ヒト幹細胞順化培養液	-
Defined Cell Culture Media 9	Defined Cell Culture Media 9	規定化細胞培地 9	-
Human Adipose Derived Mesenchymal Cell Exosomes	Human Adipose Derived Mesenchymal Cell Exosomes	ヒト脂肪由来間葉系細胞エクソ솜	-
Butylene Glycol	Butylene Glycol	B G	107-88-0
Water	Aqua	水	7732-18-5
Caprylic/Capric Triglyceride	Caprylic/Capric Triglyceride	トリ (カプリル酸/カプリン酸) グリセリル	73398-61-5/ 65381-09-1
Hydrogenated Lecithin	Hydrogenated Lecithin	水添レシチン	92128-87-5
1,2-Hexanediol	1,2-Hexanediol	1, 2-ヘキサジオール	6920-22-5
Polysorbate 80	Polysorbate 80	ポリソルベート 80	9005-65-6
Caprylyl Glycol	Caprylyl Glycol	カプリリルグリコール	1117-86-8
Tocopheryl Acetate	Tocopheryl Acetate	酢酸トコフェロール	58-95-7
合計			

(圖2) RemyEV-3의 全成分表



(圖3) 하이브리드 엑소솜의 개념

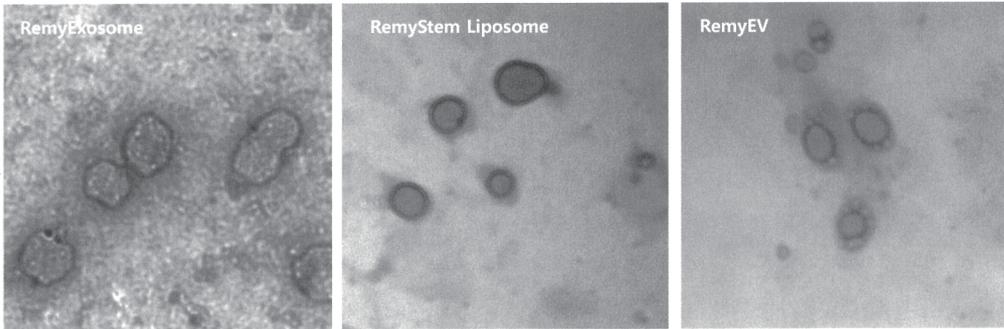


그림3 실제 exosome, liposome, hybrid exosome의 전자현미경사진

기술을 응용해 대량 생산에 적합한 마이크로 유체 기술을 이용해 인체줄기세포배양액의 리포솜과 인체줄기세포의 엑소솜 막을 융합시키고 있다. 이 조작을 함으로써 원래 갖고 있던 엑소솜 표면의 단백질이나 내부의 정보는 그대로 두고 리포솜 중의 인체줄기세포배양액이 엑소솜에 내포된다(그림2, 그림3)

4. 하이브리드 엑소솜의 *in vitro* 데이터

인체에 의한 검증하기 전에 섬유아세포에 대한 타입 I 콜라겐의 생성에 대해 하이브리드 엑소솜 'RemyEV-3'의 효과를 검증했다. 무혈청 배지에서 배양하고 있는 인체 섬유아세포 HDF에 대하여 'Remy EV-3'를 5, 10, 20, 30%의 농도가 되도록 첨가해 콜라겐 생성량을 측정했다. 그 결과가(그림4)이다.

컨트롤과 비교해 콜라겐의 생성량은 증가한다. 5~20%까지는 농도 의존적으로 콜라겐 생성량은 증가하나 30%에서는 20%와 비교해 콜라겐의 생성량은 감소했다. 당사의 인체줄기세포배양액 'RemyStem'으로

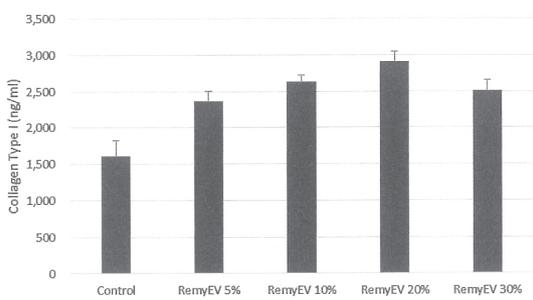


그림4 인체섬유아세포 HDF에 대한 RemyEV-3의 콜라겐 생성 효과

로 동일한 실험을 한 결과와 비교하면 'RemyStem'은 50%의 농도까지 농도 의존적으로 콜라겐의 생성량은 증가했고 콜라겐의 생성량 자체도 같은 농도로 비교하면 'RemyStem'이 더 많다.

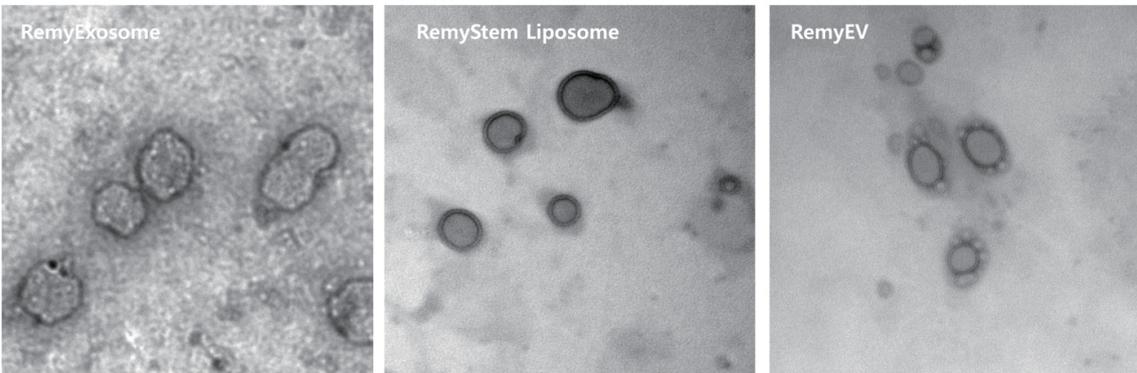
이는 배양액 중에 유효성분이 함유되어 있는 'RemyStem'에 비해 'RemyEV-3'는 그것들과 더불어 리포솜 제조 시 사용된 하이드로제네이티드 레시틴과 기타 화합물을 함유하고 있다. 높은 농도에서는 이들이 세포 독성이나 세포생리학적 부작용을 일으킬 수 있으며 세포에 직접 시료처리를 하는 *in vitro* 시험의 특성상 'Remy EV-3' 등의 리포솜 원료에 관해 30% 이상의 농도에서는 결과분석이 곤란하다는 것이 이유라고 생각할 수 있다.

5. 하이브리드 엑소솜의 주름에 대한 효과

'Remy EV-3'의 인체 눈가 주름에 대한 효과를 검증했다. 시험은 2020년 2월 10일부터 2020년 4월 10일까지 실시됐고 피험자는 평균 연령 52.67세±4.99세 여성 25명이며 그 중 4명이 탈퇴하여 최종적으로는 21명으로 시험을 종료했다. 피험자의 연령 구성은 40대 4명, 50대 17명이었다.

'Remy EV-3'가 5% 함유된 크림을 아침저녁 1일 2회 세안 후 500엔짜리 동전 크기의 양을 얼굴 전체적으로 피부 결을 따라 도포한 뒤 가볍게 두드려 흡수시켰다. 측정은 피검 제품 사용 전과 사용하고 2주, 4주 후에 했다. 또한 눈가의 주름 외에도 피부 밝기 개선이나 피험자에 대한 설문조사, 피부의 이상 반응 등에 대해서도 조사를

(图4) 実際の exosome, liposome, hybrid exosome の電子顕微鏡写真

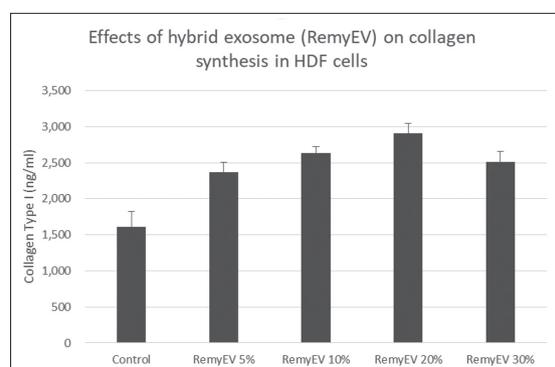


4. 하이브리드 엑소솜의 *in vitro* 데이터

히토による検証を行う前に、線維芽細胞に対するタイプ I 콜라겐의 생성에 대해 하이브리드 엑소솜 'RemyEV-3'의 효과를 검증했다. 무혈청培地で培養しているヒト線維芽細胞HDFに対して、'RemyEV-3'を5、10、20、30%の濃度になるよう添加し、コラーゲンの生成量を測定した。その結果が(图5)である。コントロールと比較して、コラーゲンの生成量は増加する。5~20%までは濃度依存的にコラーゲンの生成量は増加するが、30%では20%と比較して、コラーゲンの生成量は減少している。弊社のヒト幹細胞培養液『RemyStem』の同様の実験結果と比較すると、『RemyStem』は50%の濃度まで濃度依存的にコラーゲンの生成量は増加し、コラーゲンの生成量自体も同じ濃度で比較すると『RemyStem』の方が多い。これは培養液中に有効成分が含有されている『RemyStem』に対して、『RemyEV-3』はそれらに加えリポソーム製造時に使用された水添レシチンとその他の化合物を含んでいる。高濃度ではこれらが細胞毒性や細胞生理学的副作用を引き起こすことがあり、細胞に直接試料処理する *in vitro* 試験の特性上、『RemyEV-3』などのリポソーム原料について30%以上の濃度では結果分析に困難があることが理由と考えられる。

5. 하이브리드 엑소솜의 시약에 대한 효과

'RemyEV-3'의 히토의 눈가의 시약에 대한 효과를 검증했다. 시험은 2020년 2월 10日から 2020년 4월 10日に行われ、被験者は平均年齢 52.67歳±4.99歳の女性 25人で、うち 4名がドロップアウトし、最終的には 21名で試験を終了した。被験者の年齢構成は 40代 4人、50代 17人となっている。『RemyEV-3』を 5%含有するクリームを朝夕 1日 2回、洗顔後 500円硬貨大の量を顔全体に肌のキメに沿って塗布した後、軽く叩いて吸収させた。測定は被検製品使用前、使用から 2週間・4週間後に行なった。また、目元のシワ以外にも肌の明るさの改善や、被験者へのアンケート、皮膚の異常反応などについても調査を行なった。



(图5) 히토線維芽細胞HDF에 대한 RemyEV-3의 콜라겐 생성 효과

실시했다.

5-1. Antera3D

피부 영상 진단은 화장품의 효과를 객관적으로 판단하는 것이 가능하기 때문에 의료기관 뿐만 아니라 화장품 업계에서도 널리 이용되고 있다. 최근 핸드 타입으로 운반이 가능하면서 간편한 조작이면서 신뢰성이 높은 피부 국소 분석, 평가 가능한 Antera3D(Miravex Limited, 더블린, 아일랜드)라는 기종이 판매되고 있다. 가시광선 스펙트럼의 대부분에 걸친 7개의 다른 파장의 LED 광원 하에서 복수의 영상을 촬영하고 그 데

이터를 바탕으로 3D로 피부를 재구성하기 때문에 기존 기기보다 주름의 측정에 대한 감도가 높다는 보고도 있다¹⁴⁾. 이번에는 이 Antera3D를 이용해 'RemyEV-3'의 주름에 대한 평가를 실시했다.

5-2. 결과

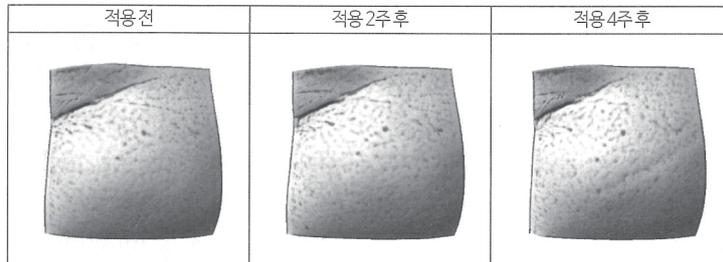
주름의 전체적인 길이, 깊이, 폭, 최대 깊이에 대한 경과는(표2)와 같다. 주름의 전체 길이는 피검 제품 사용 전과 비교해 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.001$)로 감소했으며 각각 10.590%, 13.951% 감소를 확인했다. 주름 깊이에 대해서는 사용

표2 RemyEV-3를 1일 2회 4주간 사용했을 때의 눈 주위 주름의 측정 결과

		적용전	적용 2주 후	적용 4주 후
길이	평균±표준편차	14.138±7.373	12.391±5.926	12.026±6.156
	유의확률 ¹⁾	-	<0.001***	<0.001***
깊이	평균±표준편차	0.046±0.018	0.043±0.017	0.042±0.017
	유의확률 ¹⁾	-	<0.024*	<0.003*
폭	평균±표준편차	1.289±0.097	1.233±0.087	1.239±0.116
	유의확률 ¹⁾	-	<0.012*	<0.006**
최대 깊이	평균±표준편차	0.081±0.034	0.076±0.034	0.074±0.033
	유의확률 ¹⁾	-	0.192	0.009**

1. 확률 p값(대조 시험으로 분산 분석을 반복. 우위성: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)
 2. 확률 p값(Wilcoxon의 부호 순위 검정. * $p < 0.01$, p값: Holm-Bonferroni 방법으로 p값을 측정)

연구대상자번호3



연구대상자번호19

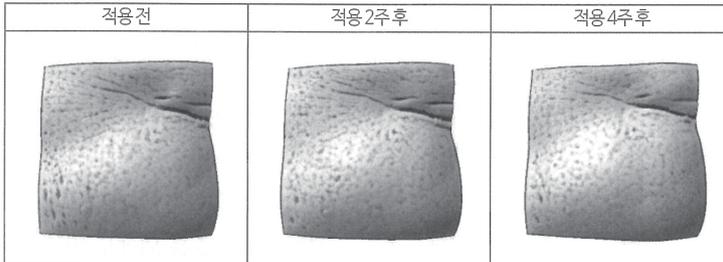


그림5 RemyEV-3를 1일 2회 4주간 사용했을 때의 눈 주위 주름의 사진

5-1. Antera3D

피부의 이미지 진단은 화장품의 효과를 객관적으로 판단할 수 있는 의료기관뿐만 아니라 화장품 업계에서도 널리 이용되고 있다. 최근 핸드 타입으로 운반이 가능하면서 간편한 조작이면서 신뢰성이 높은 피부 국소 분석, 평가 가능한 Antera3D(Miravex Limited, 더블린, 아일랜드)라는 기종이 판매되고 있다. 가시광선 스펙트럼의 대부분에 걸친 7개의 다른 파장의 LED 광원 하에서 복수의 이미지를 촬영하고, 그 데이터를 원에 3D로 피부를 재구성하기 위해, 기존 기기보다 주름의 측정에 대한 감도가 높다는 보고도 있다¹⁴⁾. 이번에는 이 Antera3D를 이용해 'RemyEV-3'의 주름에 대한 평가를 실시했다.

5-2. 결과

주름의 전체적인 길이, 깊이, 폭, 최대 깊이에 대한 경과(표 2)와 같다. 주름의 전체 길이는 피검 제품 사용 전과 비교해 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.001$)로 감소했으며 각각 10.590%, 13.951% 감소를 확인했다. 주름 깊이에 대해서는 사용

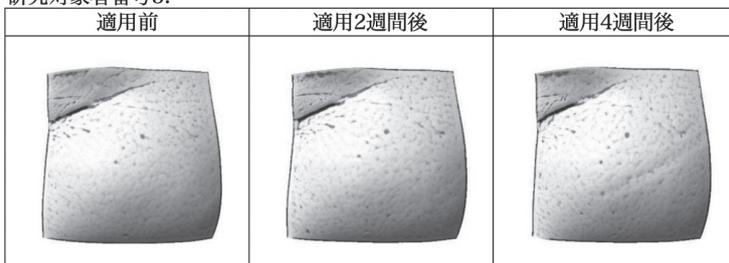
($p < 0.001$)로 감소, 각각 10.590%, 13.951%의 감소를 확인했다. 주름의 깊이에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.024$, $p < 0.003$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얕아졌다. 주름의 폭에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.012$, $p < 0.006$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얇아졌다. 주름의 최대 깊이에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.012$, $p < 0.009$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얕아졌다. 주름의 전체 길이에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.001$)로 감소, 각각 10.590%, 13.951%의 감소를 확인했다. 주름의 깊이에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.024$, $p < 0.003$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얕아졌다. 주름의 폭에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.012$, $p < 0.006$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얇아졌다. 주름의 최대 깊이에 대해서는 사용 2주 후, 4주 후에는 통계적으로 유의미한 레벨($p < 0.012$, $p < 0.009$)로 감소, 각각 4.66%, 7.623% ($p < 0.05$)로 얕아졌다.

검정 결과

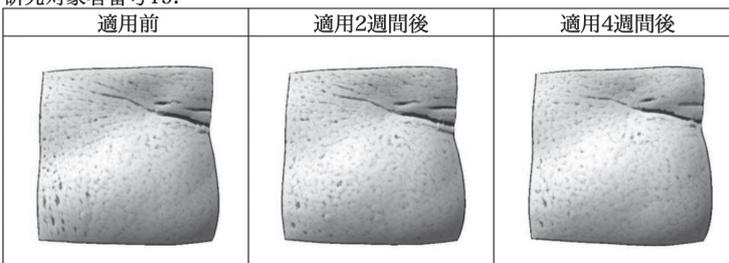
		적용전	적용 2주 후	적용 4주 후
전체 측정	평균±표준편차	14.138 ± 7.373	12.391 ± 5.926	12.026 ± 6.156
	유의확률 ¹⁾	-	< 0.001***	< 0.001***
깊이	평균±표준편차	0.046 ± 0.018	0.043 ± 0.017	0.042 ± 0.017
	유의확률 ¹⁾	-	< 0.024*	< 0.003*
폭	평균±표준편차	1.289 ± 0.097	1.233 ± 0.087	1.239 ± 0.116
	유의확률 ¹⁾	-	< 0.012*	< 0.006**
최대 깊이	평균±표준편차	0.081 ± 0.034	0.076 ± 0.034	0.074 ± 0.033
	유의확률 ²⁾	-	0.192	0.009**

1. *확률 p값(대조 시험으로 분산 분석을 반복, 우위성: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)
 2. *확률 p값(Wilcoxon의 부호 순위 검정, ** $p < 0.01$, p값: Holm-Bonferroni 방법으로 p값을 조정)

연구대상자번호3.



연구대상자번호19.



(그림6) RemyEV-3를 1일 2회 4주간 사용했을 때의 눈 주위 주름의 사진

2주간·4주간 각각 4.966%, 7.623%($p < 0.05$) 얹어졌다. 최대 깊이에 관해서는 사용 2주간에서는 유의미한 차이는 나타나지 않았으나 4주간에서 9.395%($p < 0.01$) 감소했다. 폭에 대해서는 사용 2주간, 4주간 각각 4.055%, 3.853%($p < 0.05$) 감소했다.

해석은 Wilcoxon signed rank test를 이용해 Holm-Bonferroni Method에서 p 값의 보정을 하고 있다. 21명의 증례 중 2예를 그림5에 나타냈다. 큰 주름이 개선되어있는 것을 확인할 수 있으며 주위 피부 상태가 개선되고 있는 것도 관찰할 수 있다. 탈락한 4예는 시험과인과 관계가 없는 개인적 이유에 의한 것으로 시험 기간 동안 유해한 사례 등은 관찰되지 않았다. 또한 볼 부분의 피부 밝기에 대해서도 유의미한 차이를 보이며 개선됐다.

6. 결론

‘RemyEV-3’는 그 성질상 *in vitro* 시험을 하는 것이 어려웠는데 이번에 인체에 대해 5% 함유 크림을 4주간도 포함한 것만으로 유의미한 차이가 있다는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 눈 주변 주름 개선 효과가 있는 것도 확인됐다. 도포만으로 4주라는 시험 기간은 비교적 짧다고 생각되지만 유의미한 차이가 있는 결과를 얻었다.

이러한 사실은 ‘Remy EV-3’나 엑소솜에 대해서 화장품 소재로서의 큰 가능성을 나타내고 있다고 생각한다. 엑소솜은 분비하는 세포의 상태나 배양 조건에 따라 수량이나 활성이 변화한다. 당사는 화장품 원료로서 동일 기증자의 줄기세포를 사용해 특별한 출발 배지에 의해 동일 조건에서 배양을 하여 활성 있는 엑소솜

을 얻고 있다. 앞으로는 피부의 투과나 세포로의 도입 등에 관한 시험을 하여 ‘Remy EV-3’의 화장품 원료로서의 기능성을 더욱 검증하고 싶다.

참고문헌

- 1) E.R. Abels et al., *Cell Mol Neurobiol.*, **36**(3), 301~312 (2016)
- 2) T. Katsuda et al., *Stem Cell Res Ther.*, **6**, Article No.212 (2015)
- 3) Y.J. Kim et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, **493**(2), 1102~1108 (2017)
- 4) D.B. Patel et al., *Bioeng Transl Med.*, **2**(2), 170~179 (2017)
- 5) Y. Zhang et al., *Neurochem Int.*, **111**, 69~81 (2017)
- 6) E.Y. Lee et al., *Wound Repair Regen.*, **17**(4), 540~547 (2009)
- 7) J.A. Yang et al., *Expert Opin Biol Ther.*, **10**(4), 495~503 (2010)
- 8) K.M. Aguilar-Pérez et al., *Front Bioeng Biotechnol.*, **8**, Article No.579536 (2020)
- 9) A.M.S. Simão., *Biophys Rev.*, **7**(4), 391~397 (2015)
- 10) S. Rana et al., *Int J Biochem Cell Biol.*, **44**(9), 1574~1584 (2012)
- 11) S. Horibe et al., *BMC Cancer.*, **18**(1), 47 (2018)
- 12) X. Luan et al., *Acta Pharmacol Sin.*, **38**(6), 754~763 (2017)
- 13) Y.T. Sato et al., *Sci Rep.*, **6**, Article No.21933 (2016)
- 14) F. Linming et al., *Skin Res Technol.*, **24**(1), 3~8 (2018)

6. おわりに

『RemyEV-3』はその性質上 *in vitro* の試験を行うことが難しかったが、今回ヒトに対して5%含有のクリームを、4週間の塗布のみで有意差のある結果を得ることができた。この結果から『RemyEV-3』は目の周辺のシワを改善する効果があることが示唆された。塗布のみで4週間という試験期間は比較的短いと考えられるが、『RemyEV-3』は有意差のある結果を得た。このことは『RemyEV-3』やエクソソームについて、化粧品素材としての大きな可能性を示していると考えられる。エクソソームは細胞の状態や培養条件によって、収量や活性が変化する。弊社は化粧品原料として同一ドナーの幹細胞を用い、特殊な出発培地によって、同一条件で培養を行い、活性のあるエクソソームを得ている。今後は皮膚の透過や細胞への取り込みなどについての試験などを行い、『RemyEV-3』の化粧品原料としての機能性のさらなる検証を行いたい。

(参考文献)

- 1) E.R. Abels et al., *Cell Mol Neurobiol.*, **36**(3):301-12. (2016)
- 2) T.Katsuda et al., *Stem Cell Res Ther.*, **11**;6:212. (2015)
- 3) Y.J.Kim et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, **18**;493(2):1102-1108. (2017)
- 4) D.B.Patel et al., *Bioeng Transl Med.*, **26**;2(2):170-179. (2017)
- 5) Y.Zhang et al., *Neurochem Int.*, **111**:69-81. (2017)
- 6) E.Y.Lee et al., *Wound Repair Regen.*, **17**(4):540-7. (2009)
- 7) J.A.Yang et al., *Expert Opin Biol Ther.*, **10**(4):495-503. (2010)
- 8) K.M. Aguilar-Pérez et al., *Front Bioeng Biotechnol.*, **15**;8:579536. (2020)
- 9) A.M.S.Simão., *Biophys Rev.*, **7**(4):391-397. (2015)
- 10) S.Rana et al., *Int J Biochem Cell Biol.*, **44**(9):1574-84. (2012)
- 11) S.Horibe et al., *BMC Cancer.*, **6**;18(1):47. (2018)
- 12) X.Luan et al., *Acta Pharmacol Sin.*, **38**(6):754-763. (2017)
- 13) Y.T.Sato et al., *Sci Rep.*, **25**;6:21933. (2016)
- 14) F.Linming et al., *Skin Res Technol.*, **24**(1):3-8. (2018)

Abstract: Exosomes, which are important constituents of human stem cell conditioned culture medium, are expected not only as cosmetics but also as pharmaceuticals, and are being actively researched. Research on drug delivery systems using Exosome includes a technology called hybrid exosome that fuses liposomes that artificially imitate cell membranes with exosomes that are secreted from cells. Hybrid exosome is a technology that expresses exosome proteins on the surface of liposomes and selectively incorporates them into cells. A summary result was obtained for wrinkles on the outer corners of the human eye by using a hybrid exosome in which human stem cell conditioned medium was encapsulated in liposome and fused with exosome.

Keyword : Human stem cell conditioned media, liposome, exosome, hybrid exosome, drug delivery systems

Wrinkle improvement effect of cosmetic ingredients made by hybridizing exosome and liposome derived from human stem cells using DDS Technology

Abstract : Exosomes, which are important constituents of human stem cell conditioned culture medium, are expected not only as cosmetics but also as pharmaceuticals, and are being actively researched. Research on drug delivery systems using Exosome includes a technology called hybrid exosome that fuses liposomes that artificially imitate cell membranes with exosomes that are secreted from cells. Hybrid exosome is a technology that expresses exosome proteins on the surface of liposomes and selectively incorporates them into cells. A summary result was obtained for wrinkles on the outer corners of the human eye by using a hybrid exosome in which human stem cell conditioned medium was encapsulated in liposome and fused with exosome.

Key words : human stem cell conditioned media, liposome, exosome, hybrid exosome, drug delivery systems



Lee Dong Hee*¹



Hideto Fujita*²

*¹ RemyBio Corp.

#1510, Dongtangiheung-ro 557, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 18469 KOREA

*² Material Dept., ANTI-AGEING Co., Ltd.

アンチエイジング株式会社 マテリアル事業部

〒107-0062 東京都港区南青山 3-4-6 AOYAMA346 3F

*¹ 1990 年高麗大学卒業、

2002 年延世大学 生体組織工学博士課程修了、

2004 年ソウル大学 歯学研究所研究教授、

2007 年慶熙大学 皮膚生命工学センター準教授、

現在、RemyBio Corp. CEO、アンチエイジング(株) 学術顧問 生体組織工学博士。

*² 1986 年北里大学 水産学部卒業、

現在、アンチエイジング(株) マテリアル事業部部長。

Lee Dong Hee

RemyBio Corp.

#1510, Dongtangiheung-ro 557, Hwaseong-si,
Gyeonggi-do, 18469 KOREA

1990 年 高麗大学卒業

2002 年 延世大学生体組織工学博士課程修了

2004 年 ソウル大学歯学研究所研究教授

2007 年 慶熙大学皮膚生命工学センター準教授

現在 RemyBio Corp. CEO、

アンチエイジング(株)学術顧問

生体組織工学博士

Hideto Fujita

ANTI-AGEING Co.,Ltd. Material Dept.

アンチエイジング株式会社 マテリアル事業部

〒107-0062 東京都港区南青山 3-4-6 AOYAMA346 3F

1986 年 北里大学水産学部卒業

現在 アンチエイジング株式会社 マテリアル事業部 部長