

International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2022 참석 후기

김 현 영

서울대학교 치학연구소
E-mail: hykim629@snu.ac.kr

요약문

이번 International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2022 학회는 프랑스 리옹 Convention Centre에서 2022년 5월 25일(Education day)부터 5월 29일까지 진행되었다. 학회는 전 세계 47개 국가에서 참석했으며 1,140명의 연구자들이 등록했고, 한자리에 모여 EV에 대해 학문적 교류를 했다. 2019년 일본 도쿄에서 개최된 ISEV 이후에 3년 만에 개최된 off-line ISEV 학회였다. 올해가 ISEV 10주년이 되는 해이기 때문에 학회 첫날 아침에 프랑스 밴드가 와서 노래를 해주며 ISEV의 10주년을 같이 축하해줬다. 밴드가 노래를 하며 강연장 화면에 지난 10년간 ISEV에 참석한 연구자 및 운영진들의 사진을 보니, 비록 ISEV에 처음 참석했지만 감동을 느낄 수 있었다. 학회는 총 38개의 주제로 구성된 구두 발표 세션과 37개 주제로 구성된 포스터 세션, 그리고 6명의 plenary speaker의 발표로 구성된 plenary 세션으로 구성되었다. 저자는 관련 연구에 대한 구두 발표와 EV 관련 최신 연구 동향을 파악하고자 학회에 참석하였다.

Key Words: Extracellular vesicles, Cell biology, Nanoparticle

목 차

1. 주요 발표 내용

1.1. Optimization and Standardization of EV Analysis

1.1.1. Efficient quantification of human cytomegalovirus and extracellular vesicles in cell culture samples using flow nanoanalysis.

1.1.2. Adherence to minimal experimental requirements for defining extracellular vesicles and their functions: what's new in 2022?

1.1.3. A new strategy to count and sort neutrophil-derived extracellular vesicles:

- validation in infectious disorders
- 1.1.4. Off-the-shelf, stable biological test samples to validate calibration procedures for extracellular vesicle measurements
- 1.1.5. Presence and removal of platelets from human blood plasma to improve the quality of extracellular vesicle research
- 1.2. EVs in Immunity and Inflammation
 - 1.2.1. Acute joint inflammation induces a sharp increase in EV release and modifies the phospholipid profile of synovial fluid-derived EVs
 - 1.2.2. Extracellular vesicles from antigen-presenting cells stimulate activated T cells in an antigen-dependent manner in vivo
 - 1.2.3. Extracellular vesicles from M1 and M2 primary macrophages have distinct non-coding RNA cargo; functional implications
- 1.3. EV Production and Separation
 - 1.3.1. Pre-processing of bovine milk prior to EV isolation is essential for purity, but various protocols affect colloidal and functional properties of milk EVs
 - 1.3.2. Isolation of plasma EVs by dual-mode chromatography: a head-to-head comparison between Sepharose CL-2B and Sepharose CL-4B
- 1.4. EVs in Cancer Immunology and Cancer Immunotherapy
 - 1.4.1. Antigen-loaded extracellular vesicles induce responsiveness to anti-PD-1 and anti-PD-L1 treatment in a checkpoint refractory melanoma model
 - 1.4.2. ICAM-1-mediated Adhesion is a Prerequisite for PD-L1 Exosome-induced T Cell Suppression
- 1.5. Metabolism Obesity Nutrition
 - 1.5.1. MicroRNAs from Adipocyte-derived Small Extracellular Vesicles in Patients with Alzheimer's Disease are Associated with Cognitive Impairment and Insulin Resistance
 - 1.5.2. Hepatoprotective effect of cranberry vesicles in a mouse model of diet-induced obesity
- 1.6. Microbe Human Host Communication
 - 1.6.1. Extracellular weapons against bacterial infection: protective roles of antigen-encapsulating extracellular vesicles derived from Salmonella-infected macrophages
 - 1.6.2. Are microbiota-derived outer membrane vesicles promoters of inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease?
- 1.7. Biomarkers of Neuronal Diseases
 - 1.7.1. Single-vesicle analyses validate L1CAM as a marker of blood-borne neuron-derived extracellular vesicles
 - 1.7.2. Tau, antioxidant proteins, and cellular markers are altered in brain tissue extracellular vesicles in Alzheimer's disease

- 1.7.3. Identification of neural cell type-specific molecules in the extracellular vesicles enriched from human cerebrospinal fluid and their application to Alzheimer’s disease
- 1.7.4. Extracellular vesicles: a window into the etiology of Major Depressive Disorder

2. Plenary session 발표 내용

- 2.1. Cells and EVs for organ regeneration: to each its own (Benedetta bussolati)
- 2.2. Extracellular vesicles: Major contributors to the paracrine and endocrine actions of the adipocyte (Philipp E. Scherer)
- 2.3. Oncogenic extracellular vesicles as drivers of vascular pathology in cancer (Janusz Rak)

3. 총평



그림 1. ISEV 10주년 축하공연



그림 2. ISEV학회 장소, Lyon Convention Centre(좌). 한 장으로 보는 ISEV 2022(우).

1. 주요 발표 내용

1.1. Optimization and Standardization of EV Analysis

1.1.1. Efficient quantification of human cytomegalovirus and extracellular vesicles in cell culture samples using flow nanoanalysis.

내용: Human cytomegalovirus (HCMV)는 헤르페스 바이러스의 일종으로, 감염 시 바이러스 감염에 의한 EV의 생성을 촉진한다. 이 연구진은 EV 입자를 세포 배양액에서 순수 분리할 수 있는 방법을 고안했다. 그 이유는 감염이 안된 세포의 EV와 감염된 세포에서 분비된 EV를 각각 구별하고 labelling 하는 것은 힘들기 때문이다. EV 정제는 일반적인 방법을 사용하였으며 (1,000 xg 에서 한번 원심분리 후, 상층액을 150,000 xg로 초고속 원심분리하고, size exclusion chromatography를 수행하였다) 이후에 핵산을 표지할 수 있는 형광염료인 SYTO13 또는 DRAQ5를 사용해서 EV를 표지한 뒤, EV 파티클의 입자 수와 크기를 flow nano-analysis (FNA)를 통해 규명하였다. 이러한 EV characterization 방법은 다른 바이러스나 바이러스 감염에 의해 생성된 EV를 빠르고 정확하게 규명하는 데 도움이 될 것이라 생각한다.

1.1.2. Adherence to minimal experimental requirements for defining extracellular vesicles and their functions: what's new in 2022?

내용: EV 연구 분야는 매우 빠르게 성장하고 있고, 전 세계의 다양한 연구소에서 연구가 진행되기 때문에 EV연구의 기본 가이드라인인 'Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles' (MISEV)가 매우 중요하다. 이 가이드라인은 2014년에 처음 발표되었으며, 2018년 개정되었다. 현재 MISEV는 EV 연구에서 중요한 기초지식으로 활용되고 있으며, 이를 중심으로 연구가 많이 발전하였다. 이 연구진은 2012년부터 2020년까지 발표된 5,093개의 EV 연구 open-access 논문에서 EV 정제와 characterization 방법을 분석하고 고찰하였다. 우선 명명법은 과거에는 exosome과 EV가 혼재되어 사용되었지만, 현재는 주로 EV라고 명명한다. 그리고 EV의 characterization은 전자현미경, 나노입자 추적장치, EV marker antibody를 사용하여 immunoblot을 많이 활용하며, 한 가지를 사용하기보다 다양한 방법을 조합해서 characterization 한다. 가장 많이 활용되는 EV 마커는 CD63, CD81 그리고 CD9이다. 전체 분석된 논문 중 30%의 논문은 EV에서 두 가지의 마커를 확인하였고, 14%의 논문은 3가지 marker를 모두 확인하였다. 앞으로 더 다양한 분야와 기관에서 EV 연구가 수행될 것을 예상해볼 때, MISEV의 가이드라인을 준수하는 것과 EV 연구자들이 EV 정제 및 특성 규명 방법을 통일해 나가는 것은 서로의 연구에서 매우 중요할 것이다.

1.1.3. A new strategy to count and sort neutrophil-derived extracellular vesicles: validation in infectious disorders

내용: 이 연구진은 실제 환자(Ex. COVID-19 환자)에서 빠르게 neutrophil-derived EV를 정제하는 방법을 고안하였다. Neutrophil에서 분비된 EV를 정제할 때 ultracentrifugation과 size exclusion chromatography (SEC) 방법을 사용하였다. 그리고 CD15, CD66b, CD66c에 대한 antibody를 사용해서 특이성을 더 높였으며, antibody 사용 이후에 여기서 SEC를 수행함으로써 EV정제 후 남아있을 수 있는 antibody aggregate를 제거하여 EV의 순도를 높였다. 이렇게 antibody로 EV를 특이적으로 표지하여 정제 후, SEC을 수행하는 방법은, 실제 임상 샘플에서 neutrophil뿐 아니라 다양한 면역세포유래 EV를 특정 면역세포 마커에 대한 항체를 사용하여 빠르고 순도 높게 정제하여 EV를 바이오 마커로 활용할 수 있도록 하는 좋은 기술이 될 것이다.

1.1.4. Off-the-shelf, stable biological test samples to validate calibration procedures for extracellular vesicle measurements

내용: EV는 blood에 많이 발견되며, 질병의 biomarker로 활용될 수 있다. 하지만 문제점은 아직까지 비교 대상이나 기준이 모호하다는 것이다. EV가 biomarker로 활용되려면, reference material이 있어야 하고, 온전한 EV를 바로 정제할 수 있는 안정성 있는 임상 샘플을 사용해야 하며, EV 정제 농도가 reproducible 해야만 한다. 따라서 이 연구진은 plasma의 EV를 CD61과 CD235a 또는 lactadherin으로 표지한 후, size exclusion chromatography와 filtration을 수행하고, cryopreservation agent에 안정화한 뒤, -80 °C에 보관하였으며, EV 정제를 하기 전까지 각각의 plasma sample마다 보관 기간을 일정하게 유지했다. 이러한 과정을 거친 sample을 plasma-derived EV test samples (PEVTES)로 명명하였다. 그 이후에, 보관 기간에 따른 plasma에서 분리한 EV의 수득률을 확인했다. Platelet 유래 EV는 PEVTES로 보관한 지 5달까지 수득률이 일정했지만, 보관을 시작하고 6달, 10달, 12달 이후로는 수득률이 fresh sample에 비해 계속 떨어졌다. 반면에 erythrocyte 유래 EV는 12달이 지나도 수득률이 일정했다. Lab bench 상에서도 EV의 입자수의 변화를 측정하였는데, 10분부터 EV 입자수는 감소하였으며, 100분이 지나면 20%, 300분이 지나면 50% 이상이 감소했다. 하지만 EV를 BSA 용액에 보관하면 시간이 지나도 particle 수가 유지되었다. 따라서 PEVTES는 앞으로 EV를 임상에서 biomarker로 활용하는 연구에 활용될 것이다.

1.1.5. Presence and removal of platelets from human blood plasma to improve the quality of extracellular vesicle research

내용: Blood에서 EV를 정제해서 임상적으로 진단에 활용하고자 할 때 platelet이 contamination 되는 것은 큰 문제이다. Platelet은 실제로 EV 정제 과정에서 쉽게 같이 정제되는 물질 중 하나다. 만약 EV 정제 후에 RNA sequencing과 같은 실험을 한다면, platelet에도 수많은 RNA가 있기 때문에 정확한 결과를 얻기가 어렵다. 따라서 이 연구의 목적은 blood 유래 EV정제에서 platelet을 제거하는 것이다. Platelet은 centrifugation해도 존재하며, freeze-thawing을 반복하여도 보통 세포는 제거되는 반면, platelet은 잘 제거되지 않았다. 따라서 EV 농도와 물성에 영향을 주지 않으면서 platelet을 제거하기 위해 800 nm pore size의 polypropylene filter를 사용했다. 이 filter를 사

용하면 platelet은 거의 사라짐을 알 수 있었으며, EV marker를 staining 후 EV의 수를 확인해 보니 filter 자체가 EV의 수에는 영향을 주지 않았다. 따라서 blood에서 EV를 biomarker로 활용하고자 할 때, 800 nm의 pore size를 가진 polypropylene filter를 사용한다면 EV를 통해 더 정확한 질병 진단을 할 수 있을 것이다.

1.2. EVs in Immunity and Inflammation

1.2.1. Acute joint inflammation induces a sharp increase in EV release and modifies the phospholipid profile of synovial fluid-derived EVs

내용: 관절 질환에서 염증은 항상 수반됨. 발표자는 EV가 염증성 질환에서 중요한 염증 매개 물질로 작용할 것이라는 가설을 세웠다. 말(horse)을 포함한 동물들도 관절염에 걸려서 고생한다. 따라서 동물실험모델로 말에 LPS로 급성 관절염을 유도하는 모델을 사용하였다. 말에 LPS를 injection 후, 5시간, 24시간, 48시간 후에 관절에서 synovial fluid (SF)를 얻었다. 그리고 각각 시간대에서 얻은 SF에서 EV를 differential ultracentrifugation과 density gradient-ultracentrifugation으로 정제하였다. LPS 주입 후, 초반 5-8시간대에 EV의 수가 급격히 증가하고, 시간이 증가할수록 수가 감소했다. 10 K EV와 200 K EV를 나누어서 정제하였으며, 이들의 phospholipid profile을 분석했다. 그 결과, LPS 주입하지 않은 말에서 얻은 SF 대비 LPS 주입 후 말에서 얻은 SF에는 phospholipid에 변화가 있었으며, hexosylceramides라는 류머티즘 관절염에서 염증을 유도하는 물질이 많음을 관찰했다. 따라서, 급성 감염으로 유도된 관절염에서, SF에 분비된 EV가 인지질 구성에 변화가 생기고, 그중 hexosylceramides의 증가가 염증을 유도할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

1.2.2. Extracellular vesicles from antigen-presenting cells stimulate activated T cells in an antigen-dependent manner in vivo

내용: 그동안 많은 antigen presenting cell (APC) 유래 EV 연구가 진행되었지만, in vivo에서 APC-EV에 대한 면역학적 활성을 test 한 연구가 없다. APC-EV 정제 후, 선택적으로 형광 표지를 하기 위해, Ca²⁺ 비의존적인 phosphatidylserine (PS) binding reagent를 개발했다. 이 형광 표지로 세포 중에서 EV-positive cell과 apoptotic cell을 구분할 수 있다. LCMV를 infection 했을 때 spleen에서 B cell과 CD8⁺ T cell이 EV를 많이 증가시키는 것을 관찰하였고, CD8⁺ T cell에 초점을 맞추어 연구를 진행하였다. EV를 분비하는 CD8⁺ T cell의 경우 T cell을 priming 할 수 있는 인자들을 많이 발현하고 있는 것으로 규명됐다. Bone marrow-derived dendritic cell에 강력한 TLR ligand인 LPS를 처리하고, priming 된 dendritic cell에서 분비된 EV를 마우스에 주입하였더니, 오직 antigen을 발현하고 있는 EV만 선택적으로 T cell의 NFAT 활성화를 유도했다. 이러한 작용이 antigen specific 한지 알아보기 위해 ovalbumin을 자극한 dendritic cell에서 정제한 EV가 ovalbumin-specific T cell receptor를 발현하는 T cell에 선택적으로 작용함을 확인했다. 따라서, immune activation 된 dendritic cell 유래 EV는 선택적으로 T cell의 활성화를 유도할 수 있음을 규명하였다.

1.2.3. Extracellular vesicles from M1 and M2 primary macrophages have distinct non-coding RNA cargo; functional implications

내용: Blood에서 monocyte를 분리하고, 일반적인 M1 macrophage 분화 조건(GM-CSF+LPS+IFN γ)과 M2 macrophage 분화 조건(M-CSF+IL-4+IL-13) 으로 macrophage 분화를 유도했다. 그리고 각각 M1과 M2 macrophage로부터 EV를 SEC 방법으로 분리했다. EV의 size 자체는 M2-EV가 M1-EV보다 작았다. 그리고 M1-EV와 M2-EV의 small non-coding RNA의 profile을 분석했다. M1-EV는 M2-EV에 비해 miRNAs가 많고 tRNA fragment가 적었다. miR-99b/let-7e/mir-125a가 M1-EV에 발견됐는데, 이들은 세포분열, invasion 그리고 migration에 관여한다. 그리고 HEK-BLUE TNF- α reporter cell에서 M1-EV와 M2-EV는 모두 TNF- α 에 의해 유도된 SEAP의 activity를 낮췄다.

1.3. EV Production and Separation

1.3.1. Pre-processing of bovine milk prior to EV isolation is essential for purity, but various protocols affect colloidal and functional properties of milk EVs

내용: 우유 (모유) 유래 EV에 대한 연구는 최근 EV 연구분야에서 각광받는 연구 주제이다. 우유는 다양한 물질이 혼재되어 있는 너무 복잡한 액체라서 EV만 순수 정제하는 것은 기술적으로 쉽지 않다. 우유에는 casein micelle, lipoprotein, antibody, protein, carbohydrates from microbiome, EV가 혼재되어 있다. 그중에서도 EV 정제가 어려운 이유는 EV의 size와 density가 casein micelle과 겹치기 때문이다. 따라서 casein을 먼저 HCl로 acidification 시키거나 EDTA 또는 sodium citrate를 넣어서 파괴하는 시도를 했다. 그리고 나서 density gradient floatation과 size exclusion chromatography (SEC) 방법으로 EV를 정제하면 순도 높은 EV를 얻을 수 있다. 하지만 HCl, EDTA, sodium citrate 자체가 EV나 그 안에 존재하는 단백질에도 영향을 줄 수 있는 것으로 보인다. 추후에 더 좋은 우유 유래 EV 정제 방법에 대한 연구가 필요해 보인다.

1.3.2. Isolation of plasma EVs by dual-mode chromatography: a head-to-head comparison between Sepharose CL-2B and Sepharose CL-4B

내용: Plasma에는 EV, non-EV particles, platelets, lipoproteins 그리고 chylomicrons이 함께 존재하기 때문에 EV를 순수 정제하는 것이 쉽지 않다. 특히 lipoprotein의 경우 plasma 1 ml 당 10^{16} particles이 존재하고, EV는 10^7 - 10^8 particles이 존재한다. 만약 EV 정제 시 size exclusion chromatography (SEC) 방법을 사용한다면 chylomicron이 large EV와 겹치며, platelet과도 겹쳐지게 됨. 따라서 순수 EV를 분리하기 위해서 column을 두 개 섞어서 사용한다. CL-2B column (75 nm)와 Fractogel column (type EMD SO $_3^-$ (M))을 혼합해서 EV를 정제하면, 가장 순도 높은 EV를 얻을 수 있다.

1.4. EVs in Cancer Immunology and Cancer Immunotherapy

1.4.1. Antigen-loaded extracellular vesicles induce responsiveness to anti-PD-1 and anti-PD-L1 treatment in a checkpoint refractory melanoma model

내용: Immune checkpoint blockade는 일부의 암환자에게만 적용이 가능하다. 그리고 cold tumor에는 효과가 없는 경우가 매우 많다. 따라서 hot tumor로 만드는 게 중요하다. 이 연구진은 antigen을 DC-EV에 loading 해서 indirect T cell activation을 유도하는 방법으로 항암치료를 고안했다. 항암치료 방법으로 combination strategy를 생각했고, dendritic cell의 EV를 정제해서 antigen-specific T cell 반응을 유도함을 확인하고, EV injection만으로 종양의 성장을 억제함을 확인했다. EV 단독보다 EV와 anti-PD-1/anti-PD-L1의 조합은 OVA-specific CD8⁺ T cell의 수를 증가시켰으며, 마우스 prophylactic model에서 생존율을 증가시킨다.

1.4.2. ICAM-1-mediated Adhesion is a Prerequisite for PD-L1 Exosome-induced T Cell Suppression

내용: PD-L1은 tumor-EV에도 발현이 돼 있어서, 이 EV가 전신을 돌아다니게 되면 T cell을 exhaustion 상태로 만든다. 이 연구진은 어떻게 tumor EV가 T cell을 타깃 하는가에 대한 의문을 가졌다. Tumor-EV를 확인을 해보니 adhesion molecule인 ICAM-1이 발현돼 있고, PD-L1 또한 발현돼 있었다. PD-L1보다 ICAM-1이 tumor-EV가 T cell과 상호작용하는데 매우 중요함을 밝혔다. 따라서 tumor-EV에서 ICAM-1은 T cell을 타깃 하는 장치로 작용을 하며, T cell의 면역억제 작용은 tumor-EV에 발현되어 있는 PD-L1에 의해 발생한다. 이 발표자는 tumor-EV를 총알이 아닌 PD-L1 운반체로서 드론에 비유했다.

1.5. Metabolism Obesity Nutrition

1.5.1. MicroRNAs from Adipocyte-derived Small Extracellular Vesicles in Patients with Alzheimer's disease are Associated with Cognitive Impairment and Insulin Resistance

내용: 비만은 알츠하이머병의 위험을 증가시킨다. 이는 adipose 유래 어떤 물질이 알츠하이머 발병에 관여한다고 생각할 수 있다. Adipocyte 유래 EV가 인슐린 저항성을 유도할 수 있다는 보고가 있으며, 인슐린 저항성은 알츠하이머 발병에 중요한 요인 중 하나이다. 따라서 뇌척수액과 혈청을 19명의 알츠하이머 환자와 14명의 정상인에게서 얻어서 EV를 정제하는 데 쓰이는 시약 중 하나인 Exoquick으로 침전시킨 후, antibody로 selection 하는 방법을 통해 EV를 정제했다. 이렇게 각각 얻은 EV에서 miRNA를 profiling 했다. 혈청과 뇌척수액 자체의 miRNA 발현은 상당히 유사성이 있었다. 혈청에서는 환자와 정상 샘플을 비교했을 때 189개의 miRNA가 차이가 있었으며, 뇌척수액에서는 251개가 차이가 있었다. 알츠하이머와 인슐린 신호전달에 관련된 miRNA가 환자 혈청-EV와 환자 뇌척수액-EV에서 모두 증가해 있었다. AD 환자 유래 EV 내의 miRNA를 봤을 때 정상인에 비해

인슐린 수용체와 IGF-1 신호전달의 감소가 예상된다. 이 miRNA의 자세한 기능에 대한 연구는 아직 진행 중이다.

1.5.2. Hepatoprotective effect of cranberry vesicles in a mouse model of diet-induced obesity

내용: Plant-derived nanoparticle 또는 EV는 각광을 받고 있는 연구 주제이다. 식물이나 과일에서 방출된 EV가 장질환이나 대사질환을 완화한다는 보고가 많다. 크랜베리 또한 당뇨와 같은 대사질환을 완화하는 효과를 갖고 있다. 하지만 크랜베리 유래 EV에 대한 연구는 없기 때문에 이 연구를 수행했다. 크랜베리를 주스 형태로 만든 다음, differential ultracentrifugation과 sucrose gradient ultracentrifugation 방법으로 EV를 정제했다. Highfat-diet induced obesity 마우스 모델을 활용하여 대사질환을 유도하였고, 크랜베리-EV를 주입한 마우스의 경우 몸무게 감소 효과와 더불어 지방조직의 감소도 있었다. 크랜베리-EV에 의한 마우스 먹이 섭취 감소는 없었다. 크랜베리-EV를 주입한 마우스의 간에서 triglyceride와 cholesterol의 감소가 있었다. 따라서 크랜베리-EV는 대사질환이나 비알코올성 지방간과 같은 질환을 치료하기 위한 좋은 물질로 활용될 것이다.

1.6. Microbe Human Host Communication

1.6.1. Extracellular weapons against bacterial infection: protective roles of antigen-encapsulating extracellular vesicles derived from Salmonella-infected macrophages

내용: *Salmonella typhimurium*은 그람음성 병원균으로, 아직까지 백신이 없다. 이들은 세포 내부로 침투하는 intracellular pathogen이며, 따라서 세포 내부에서 생성되는 EV 메커니즘에 영향을 줄 것이라 생각했다. Salmonella를 감염시킨 macrophage에서 EV (sEV)를 정제하고, BALB/c 마우스에서 후천성 면역반응을 유도할 수 있는지 평가했다. 프로테오믹 분석을 수행해 보니 sEV는 면역원성이 높다고 알려진 Salmonella protein들도 함유하고 있었으며 실제로 마우스에서 Th1 response를 증가시켰다. 그리고, 마우스에 immunization 시, Salmonella 특이적인 IgG나 IgA의 생성도 촉진하였고, sEV로 immunization 한 그룹에서는 박테리아 감염 시 생존해 있는 박테리아의 수를 낮추고, 감염에 의한 마우스의 생존율을 증가시켰다. sEV가 Salmonella 특이적 항체도 생산할 수 있을 뿐 아니라 Th1 반응을 효과적으로 유도하기 때문에 Salmonella에 대한 백신으로 유망할 것이라 기대하며, 비슷한 감염 경로를 가진 다른 intracellular pathogen에 대한 백신의 개발에도 이러한 연구 방법이 활용될 것으로 기대한다.

1.6.2. Are microbiota-derived outer membrane vesicles promoters of inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease?

내용: Gut-brain axis는 최근 파킨슨병을 포함한 뇌질환 연구에서 각광받는 연구분야이다. 장 마이크로바이옴이 전신적 신경성 염증을 유도할 수 있기 때문이다. 하지만 정확한 메커니즘에 대한

연구는 부족하다. 따라서 이 연구진은 그람음성 세균으로부터 분비되는 outer membrane vesicle (OMV)가 중요한 역할을 할 것이라 기대하고 실험을 진행했다. 실제로 EV는 인체 내의 혈액이나 대변에 많이 존재하며, blood-brain barrier를 잘 통과한다고 알려져 있다. Mouse feces에서 bacterial membrane vesicle (BMV)를 얻어서 microglial cell line에 처리하였더니 NO와 TNF가 올라간 것을 확인했다. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 주입한 파킨슨병 마우스 모델에서 *E. coli*-OMV를 주입하면 마우스 대변량이 줄어들고, 무게도 감소했다. Ileal에서 TNF는 증가시키지만 IL-1 β 는 증가시키지 못했다. 또한 BMV는 MPTP 마우스 모델에서 파킨슨병 증상을 모방한 pole test에서 마우스의 반응속도를 느리게 하였고, BMV뿐 아니라 *E. coli*-OMV도 같은 효과를 나타냈다. 따라서 세균 유래 OMV가 gut-brain axis에서 파킨슨병을 유도할 수 있는 가능성을 제시하였다.

1.7. Biomarkers of Neuronal Diseases

1.7.1. Single-vesicle analyses validate L1CAM as a marker of blood-borne neuron-derived extracellular vesicles

내용: L1CAM은 neuronal cell adhesion molecule으로, neuron-derived extracellular vesicles (NDEVs)의 extracellular membrane marker로 알려져 있으며, 뇌 질환의 바이오마커로서 EV정제 시면역침강법의 타겟으로 많이 사용된다. 하지만 최근 연구들에 따르면 L1CAM이 EV와 상관없는 물질이라는 가능성도 제시되고 있기 때문에 L1CAM가 NDEV에 발현되어 있는지 확인하기 위해 좀 더 자세한 연구가 필요하다. Size exclusion chromatography (SEC; Izon® qEV10/70 nm columns)와 Simoa® assay, 그리고 intact EV Luminex assay를 통해서 pan-tetraspanin positive EV에서 L1CAM을 감지하도록 실험을 디자인했다. Intact EV Luminex assay 결과 EV-associated L1CAM은 SEC fraction 중 앞부분에서 발견됐다. 그리고 형광현미경으로 확인했을 때, L1CAM positive 한 입자에서 EV의 마커인 Alix 나 VAMP2가 같이 detection 됐다. 따라서 L1CAM은 NDEV마커로서 활용될 수 있는 타겟 물질이다.

1.7.2. Tau, antioxidant proteins, and cellular markers are altered in brain tissue extracellular vesicles in Alzheimer's disease

내용: 알츠하이머병은 천천히 진행되는 신경퇴행성 질환으로, 단백질의 축적과 신경염증 등으로 인해 발병한다. 최근 EV가 알츠하이머병의 진행에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다. 뇌조직에서 방출된 EV (Brain tissue derived EVs, bdEVs)는 국소적 작용뿐 아니라, 중추신경계를 벗어나 돌아다닐 수 있다. 정상 뇌를 가진 사람에게서 얻은 bdEVs와 알츠하이머병이 있는 환자에서 얻은 bdEVs를 분리해 내고, 프로테오믹을 분석한다면 질병 진단에 활용하기 좋을 것이다. 사후 인간 뇌조직 (알츠하이머 그룹, n=23; 정상 그룹, n=7)에서 EV를 분리하여 알츠하이머병 진행에 중요한 단백질과 마커들을 electrochemiluminescence-linked (ECL) immunoassay 방법으로 분석했다. Total tau, phosphorylated tau, 그리고 antioxidant proteins peroxiredoxin 1 (PRDX) 1 그리고 PRDX6가 정상 뇌조직 대비 알츠하이머 그룹 뇌조직으로부터 얻은 bdEV에서 유의적으로 증가했다. 그리고, EV의

surface marker 또한 알츠하이머 그룹의 bdEV에서 증가했는데, 이는 알츠하이머병의 뇌조직에서 세포 활성화와 EV 자체의 생성이 정상 뇌조직에 비해 증가했음을 의미한다.

1.7.3. Identification of neural cell type-specific molecules in the extracellular vesicles enriched from human cerebrospinal fluid and their application to Alzheimer's disease

내용: 중추신경계의 거의 모든 세포가 EV를 분비하는 것으로 알려졌으며, 분비된 EV는 뇌척수액에서도 발견된다. 따라서 이렇게 분비된 EV를 profiling 하는 것만으로도 알츠하이머 병인 기전을 연구하는 데 도움이 될 것이다. 우선 중추신경계를 이루는 세포들의 EV 특이적 마커를 발굴했다. Pluripotent stem cell-derived excitatory neuron (e.g., NCAM1, ATP1A3), astrocytes (e.g., LRP1, ITGA6), microglia-like cells (e.g., LCP1, ITGAM) 그리고 oligodendrocytes (e.g., LAMP2, FTH1) 임. 이러한 마커들로 분석했을 때, 알츠하이머 환자의 뇌척수액에는 astrocyte와 microglia로부터 방출된 EV의 비율이 mild cognitive impairment (MCI)나 정상 그룹에 비해 높았다. EV 단백질을 분석한 결과, HSPA1A, NPEPPS, PTGFRN이 알츠하이머 발병과 관련이 있었고, 알츠하이머병과 MCI에서 PTGFRN이 amyloid plaque와 tangle scores와 관련을 보였다. 따라서 MCI에서 알츠하이머로 병의 진행을, neural cell type-specific EV의 마커인 HSPA1A, NPEPPS, PTGFRN을 통해서 예측할 수 있을 것으로 생각한다.

1.7.4. Extracellular vesicles: a window into the etiology of Major Depressive Disorder

내용: Major depressive disorder (MDD)는 여성에게서 더 발병 빈도가 높다. 43명의 MDD 뇌조직과 43명의 정상 뇌조직에서 EV를 분리했다. EV 정제는 뇌조직에 collagenase를 처리한 후, debris, large cell, 그리고 large vesicle을 differential centrifugation으로 제거하고, 상층액을 size exclusion chromatography에 사용하여 EV를 정제했다. 그리고 EV에서 RNA를 추출해서 male EV와 female EV의 RNA profile을 비교했더니, 그룹 간 유의적으로 차이 나는 miRNA가 있었다. MDD Male EV에선 microglia specific miRNA가 증가했고, MDD female EV에선 virus 감염 시 올라가는 TNF나 TLR4, 그리고 cytokine의 발현을 조절하는 miRNA가 증가했다.



그림 3. 학회장 포스터 발표장 모습

2. Plenary session 발표 내용

2.1. Cells and EVs for organ regeneration: to each its own (Benedetta bussolati)

내용: 인체는 진화적으로 조직 재생 능력을 선택하는 대신 조직이 다양하게 분화할 수 있는 complexity를 선택했다. 따라서 조직이나 기관이 손상되면 재생이 쉽지 않거나 불가능하다. 그래서 stem cell therapy나 요즘엔 stem cell-derived EV로 therapy 연구가 활발하게 진행 중이다. Organ 치료는 크게 3가지이다. 1. Organ replacement. 2. Organ regeneration. 3. Organ repair. Organ replacement의 사례로는 skin stem cell로 눈(eye) 재생 연구가 있으며 피부 화상의 경우 skin에 lentivirus를 감염해서 키우고, 그 세포를 다시 피부에 이식해서 화상을 치료한 경우가 있다. 또한 당뇨병은 stem cell derived islet으로 치료한 사례가 있다. 좀 더 복잡한 organ인 간의 경우, 간이식이 필요한 태아에게 human liver stem cell을 키워서 아기에게 주입해서 간이식 전까지 아기를 살릴 수 있다. 마지막으로 organ repair에서 mesenchymal stromal cell을 연구하였는데, 이 세포가 분비하는 물질 중에 EV도 포함되어 있다. MSC-EV는 tissue protection과 immunomodulation 효과가 있다. 또한 MSC-EV는 장기이식 전에 장기를 온전하게 유지하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면 간 이식 전에 간에 관류를 통해서 MSC-EV를 흘려보내 주게 된다면 장기의 apoptosis를 막을 수 있다.

결론은 1. STEM cell은 효과도 좋고 간단한 기관을 재생시킨다. 2. Organ stem cell infusion은 손상되거나 유전적 결함이 있는 세포를 고치지만 그들의 효과는 조직에서는 제한적이며 아마도 paracrine 메커니즘이 중요할 것으로 생각된다. 3. 앞으로는 MSC와 MSC-EV가 세포나 조직 치료에 중요한 tool이 될 것이고, EV는 치료제로서 세포보다 장점이 많다.

2.2. Extracellular vesicles: Major contributors to the paracrine and endocrine actions of the adipocyte (Philipp E. Scherer)

내용: Adipocyte는 다양한 물질을 분비하는데, 이들은 autocrine, paracrine 그리고 endocrine pathway를 통해 세포의 기능을 조절할 수 있다. Adipocyte들도 EV를 분비함. Adipocyte는 calveolae가 많은데, 이는 EV를 많이 분비할 수 있음을 의미한다. 실제로 calveolin KO adipocyte를 통해 증명하였다. Adipocyte는 미토콘드리아 스트레스에 반응해서 small extracellular vesicle (sEV)를 분비한다. sEV는 lipid droplet을 함유하고 있으며, adipocyte 유래 miRNA들, adipokine 그리고 adiponectin도 함유하고 있다. 또한 기본적으로 다양한 protein과 lipid 그리고 tetraspanin과 MHC class I과 II 모두 가지고 있으며, sphingolipid도 갖고 있다. sEV의 경우 adipocyte, tumor, monocyte-macrophage, endothelial cell 등 다양한 세포에 이러한 물질을 전달하고 작용할 수 있는 가능성을 가졌다. 그리고 최근 연구에 따르면 obesity와 같은 대사적 스트레스를 받은 adipocyte에서 분비된 sEV는 산화적으로 손상된 미토콘드리아 입자 (oxidatively damaged mitochondrial particles)를 갖고 있는데, 이 입자가 cardiomyocytes에 전달되면 ROS의 방출을 유도할 수 있다. 즉, 스트레스 상황에서 adipocyte로부터 분비된 sEV가 전신으로 이동해서 심장에 작용하면, 비만에 의해 유도된 지방 독성이나 허혈성 스트레스에 의한 심장을 보호할 수 있는 역할도 할 수 있다.

2.3. Oncogenic extracellular vesicles as drivers of vascular pathology in cancer (Janusz Rak)

내용: Oncogenic EV가 vascular pathology에 관여할 수 있다. 암세포가 없는 암, 즉 암세포 유래 EV가 tumor의 angiogenesis를 유도할 수 있다. 암세포 유래 EV (glioblastoma-derived EV)는 암세포의 genome과 epigenome을 함유하고 있기 때문에 이런 유전정보들을 endothelial cell에 전달을 해주면 그곳에서 발현이 돼서 기능을 할 수 있다. Glioblastoma-EV는 oncogenic EGFR을 가지고 있다. 실제로 마우스 모델에서 glioblastoma 유래 EGFR (epidermal growth factor receptor)-positive EV만 마우스에 주입해도 angiogenesis가 증가한다(CD31의 발현 증가). 그리고 CRISPR/Cas9 방법으로 EGFR을 knockout 하면, glioblastoma-derived EV에 의해 생성된 microvessel이 감소함을 확인했다. 또한 glioblastoma-EV에 의해 생성이 촉진된 microvessel은 anti-VEGF인 DC101 단독으로는 억제되지 않았으며, demethylation agent인 DAC를 DC101과 함께 처리해야 angiogenesis 억제 효과가 좋았다.

3. 총평

EV는 모든 생명체가 분비하는 물질로, 분비되는 기원에 따라 역할이 매우 다양하다. EV는 질병의 진단과 치료에 유용하고, 생성되는 세포의 종류에 따라 질병의 발생에도 기여하는 물질이다. 이러한 EV 역할의 다양성 때문에 전 세계 각기 다른 분야의 다양한 연구자들이 많은 관심을 두는 것 같다. ISEV에서 EV는 생명과학 분야의 연구자들뿐만 아니라 공학 분야의 연구자들에게도 매우 흥미로운 연구 주제였다. ISEV 학회가 10년째 열리고 있지만, 아직까지 EV에 대한 올바른 정제 방법 확립은 중요한 주제 중 하나였다. 지금까지 많은 과학자들이 최적의 EV정제방법에 대해 고민을 많이 하면서 MISEV와 같은 가이드라인도 등장했지만, EV를 정제할 샘플의 양과 질에 따라서 실험실마다 정제 방법을 통일하는 것은 쉽지 않은 것 같다. 정제된 EV의 양과 질 두 가지의 균형을 잘 맞출 수 있는 정제 방법을 선택하는 게 EV 연구를 하기에 앞서 가장 중요한 부분이라 생각한다. 이번 ISEV 2022 학회는 한국에서도 다양한 기관에서 참석을 많이 했다. 그만큼 한국의 학계와 산업계에서도 EV에 대한 관심이 높은 것 같다. 대한민국에서 우수한 EV 관련 연구와 결과물이 많이 나오기를 기대해 본다.



그림 4. Coffee break. 토론하느라 바쁜 연구자들 모습.

The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information

김현영(2022). International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2022 참석 후기. BRIC View 2022-C03.
Available from <https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=4156> (Jun 16, 2022)

Email: view@ibric.org