



Biochemical and Biophysical Research Communications  
493(2017)1102-1108

**ヒト臍帯血間葉系幹細胞に由来するエクソソームは、  
ヒトの皮膚の若返りに寄与する。**

Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin

Highlights

USC-CM には、さまざまな成長因子を含む大量の上皮成長因子 (EGF) がエクソソーム型で存在します。  
USC-CM Exos は HDF によって内在化され、細胞移動とコラーゲン合成を促進しました。  
USC-CM Exos は人間のヒトの皮膚に吸収され、コラーゲンIとエラスチンの生成を促進します。

USC-CM は、フューチャーセルジャパン(株) が製造販売するベビーステム、セルコードの原料である Kang Stem Bio Tech 社製の臍帯血由来培養上清液です。



## Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin



Yoon-Jin Kim <sup>a</sup>, Sae mi Yoo <sup>a</sup>, Hwan Hee Park <sup>a</sup>, Hye Jin Lim <sup>a</sup>, Yu-Lee Kim <sup>a</sup>,  
Seunghye Lee <sup>a</sup>, Kwang-Won Seo <sup>a,\*</sup>, Kyung-Sun Kang <sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Stem Cells and Regenerative Bioengineering Institute, Kangstem Biotech CO., LTD., 2nd Floor, Biotechnology Center, #81 Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, South Korea

<sup>b</sup> Adult Stem Cell Research Center, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, South Korea

ヒト臍帯血間葉系幹細胞に由来するエクソソームは、ヒトの皮膚の若返りに寄与する。

### Abstract 抄録

ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 (UCB-MSCs) は、皮膚の創傷治癒に重要な役割を果たしており、最近の研究では、MSC 由来のエクソソームがいくつかのシグナル伝達経路を活性化することが示唆されています。本研究では、皮膚のコラーゲン合成と浸透における臍帯血幹細胞由来培養液 USC-CM (USC-CM Exos) に由来するエクソソームの役割を調べました。USC-CM には肌の若返りに関連するさまざまな成長因子があることがわかりました。私たちの *in vitro* の結果は、USC-CM Exos がヒト皮膚線維芽細胞 (HDFs) に融合され、その結果、HDFs の細胞移動とコラーゲン合成を促進することを示しました。さらに、ヒトの皮膚組織を使用して、USC-CM Exos の皮膚透過性を評価しました。結果は、Exo-Green で標識された USC-CM Exos が 3 時間後に表皮の最外層に近づき、18 時間後に徐々に表皮に近づいたことを示しました。さらに、コラーゲン I とエラスチンの発現の増加は、ヒトの皮膚での 3 日間の治療後に見られました。その結果、USC-CM Exos は人間の肌に吸収され、肌の若返りに欠かせないコラーゲン I とエラスチンの合成を促進し、USC-CM と化粧品や治療薬との統合の可能性を示しています。

### 1. はじめに

皮膚の細胞外マトリックス (ECM) は、皮膚の形態や成長や弾力性などの機能にとって重要です [1]。コラーゲンは、体の機械的保護、皮膚の脱水の防止、弾力性の維持、組織の硬さ、皮膚のしわの最小化を担っています。エラスチンは、体組織の主要な構造タンパク質であり、皮膚の真皮の深層から表層にかけて厚さが減少する繊維状タンパク質です。エラスチンは強度と自然な弾力性を提供し、組織の修復に重要な役割を果たします [2]。幹細胞技術と化粧品のコラボレーションである機能性化粧品は、現在、化粧品業界で新たなトレンドとなっています。幹細胞は、自己複製が可能で、組織に多系統の分化可能な細胞を提供できる未成熟な組織前駆細胞の集団です。幹細胞の中で、間葉系幹細胞 (MSC) は、その実用の可能性と安全性のために最も積極的に使用されています。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、胎盤、臍帯血などのさまざまな組織から分離されます。MSC は、サイトカインと、上皮成長因子 (EGF) や塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) などのさまざまな成長因子を分泌します。これらは、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) のコラーゲン合成による皮膚の若返りと創傷治癒に重要であることがよく知られています [3e6]。最近、パラクリン効果が MSC の主要な作用メカニズムの 1 つとして評価されていますが [7]、皮膚の若返りのための成長因子におけるそれらの有益な役割にはさらなる研究が必要です [8]。臍帯血由来間葉系幹細胞 (UCB-MSC) は、さまざまな組織由来の MSC の中で最も原始的で最も若い細胞と考えられています。UCB-MSC は、他の MSC と比較してより高い含有量の創傷治癒因子を分泌します [9]。UCB-MSC は、線維芽細胞の移動、増殖、コラーゲン合成を促進します [10]。さらに、UCB-MSC 馴化培地は、皮下注射された動物を介して創傷閉鎖および再上皮化も促進します [11]。UCB-MSC の使用から得られるそのような利点から、幹細胞を使用した化粧品の開発が注目されています。特に、幹細胞の有効因子の浸透性を高めるための研究が最近行われています。脂質二重膜小胞システムは、皮膚への浸透性を高めるための最も一般的な戦略の 1 つです [12]。エクソソームは、細胞間コミュニケーションのメカニズムを備えた直径 30-100nm の小さな細胞外膜小胞です。エクソソームは、細胞間コミュニケーションのためのタンパク質と RNA を運ぶ最も広範なクラスの分泌膜小胞です [13-15]。エクソソームを介した細胞間コミュニケーションのいくつかのメカニズムが報告されています：(i) エクソソーム膜タンパク質と標的細胞上のそれらの受容体との間の相互作用、(ii) エクソソーム膜タンパク質と細胞に由来する可溶性フラグメント間の相互作用表面受容体、(iii) 標的細胞によるエクソソームの内容物の内在化 [16]。

馴化培地 (CM) の幹細胞に由来するエクソソームはナノサイズであり、皮膚表皮への浸透を介して再生効果を高める可能性があります [17]。

MSC由来のエクソソームは、局所的または静脈内に注射された動物を介した皮膚の創傷治癒に重要な役割を果たすことがわかっています [18,19]。しかし、MSC由来のエクソソームがヒトに適用されることで皮膚の再生を促進できるかどうかはまだ不明でした。本研究では、USC-CM由来のエクソソーム (USC-CM Exos) が線維芽細胞 (HDFs) によって内在化され、皮膚の再生に役立つ HDFs の移動とコラーゲン合成を促進できるかどうかを調査しました。その結果、USC-CM Exos がヒトの皮膚浸透を介してコラーゲン合成を促進できることが確認されました。これらのデータは、USC-CM Exos などのUCB-MSC由来のエクソソームが化粧品の開発と応用の可能性を秘めているという強力な *invitro* および *ex vivo* のエビデンスを示しています。

## 2. Materials and methods

### 2.1. ヒト臍帯血幹細胞由来培養液 (USC-CM) の準備

UCB-MSC は、FORMIZ WOMEN's Hospital (IRB No.219255-201305-BR-001、ソウル、韓国) によって承認されたヒト臍帯血から前述の方法で分離されました [20]。UCB-MSC を培養し、10%ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco) を含む KSB-3 (Irvine Scientific、カリフォルニア州サンタアナ) で 37°C および 5%CO<sub>2</sub> で継代 5 まで増殖させました。UCB-MSC (1.89 10<sup>5</sup> 細胞 / フラスコ) を T-25 フラスコに播種し、10%FBS を含む KSB-3 で 48 時間培養しました。PBS で 2 回洗浄した後、培地を KSB-2 培地に交換しました。EGF (10 ng / ml) および bFGF (10 ng / ml) を含む DMEM (Gibco)、その後の 96 時間のインキュベーション期間。UCB-MSC (USC-CM) の馴化培地を収集し、1500 rpm で 5 分間遠心分離し、最後に 0.22mm シリンジフィルターを使用してろ過しました。

### 2.2 USC-CM に由来するエクソソームの単離と同定

エクソソームは、exoEasy Maxi キット (QIAGEN) を使用して USC-CM から分離されました。この方法は、QIAGEN (QIAGEN GmbH、Hilden、ドイツ) によって exo Easy Maxi Kit として配布されており、標準プロトコルは exoEasy ハンドブックに記載されています。簡単に説明すると、事前にもろした USC-CM を 2x 結合バッファー (XBP) と 1 : 1 で混合し、exoEasy メンブレンアフィニティーカラムに添加して、エクソソームをメンブレンに結合させました。遠心分離後、フロースルーを廃棄し、洗浄バッファー (XWP) をカラムに加えて、特異的に保持されていない物質を洗い流しました。さらに遠心分離してフロースルーを廃棄した後、スピンカラムに溶出バッファーを加えることにより小胞を溶出し、遠心分離により溶出液を回収した。この手順により USC-CM 中のエクソソームを溶出バッファーに濃縮することができます。エクソソームの粒子数は、CD81 ExoELISA キット (System Biosciences、Mountain View、CA) を使用して、提供された指示に従って決定しました。簡単に言えば、標準曲線によって作成されました ExoELISA タンパク質標準をエクソソーム結合バッファーで段階希釈し、マイクロプレートリーダー (Tecan、Mannedorf、Switzerland) を使用して 450nm で結果を測定しました。収集されたエクソソームの形態は、100 kv の透過型電子顕微鏡 (TEM) によって観察されました。エクソソームのサイズ、濃度、および粒子サイズ分布は、NanoSight LM10 (Malvern、UK) および Nanoparticle Tracking Analysis ソフトウェアバージョン 3.0 (NanoSight) によって識別されました。

2.3. ヒト成長因子抗体アレイ ヒト成長因子抗体アレイは、Supplementary data を参照ください。

### 2.4. エクソソーム刺激による線維芽細胞のコラーゲン合成

HDFs (2x10<sup>5</sup> cells / well) を 6-well プレートに播種し、KSB-3 培地で 24 時間培養しました。洗浄後、無血清培地 (DMEM) を腹部の皮膚サンプルは、Biopredic International (Rennes、France) を通じて健康なアフリカの女性ドナー (32 歳) から入手しました。皮膚サンプルを 4 ウェルプレートにセットし、皮膚培養培地 (Biopredic International) に浸し 37°C および 5% CO<sub>2</sub> の中で培養しました。USC-CM Exos は、製造元のプロトコルに従って Exo-Green (System Biosciences、Mountain View、CA) で蛍光標識されました。標識されたエクソソームは、マイクロピペットで皮膚に塗布されました。0 時間、3 時間および 18 時間で 4%パラホルムアルデヒドで皮膚を固定した。皮膚組織を OCT 化合物 (Tissue-Tek、Sakura、日本) に包埋し、4 μm の切片に切断しました。これらの切片は、標準的なプロトコルに従ってヘマトキシリンおよびエオシンで染色されました。核は Hoechst33342 (1 : 1000、Molecular Probes) で染色されました。画像は、蛍光顕微鏡 (Nikon、東京、日本) で撮影した。含むさまざまな濃度の USC-CM Exos (Exos1; 1x10<sup>8</sup> particles / ml、Exos2; 1x10<sup>9</sup> particles / ml) をさらに 24 時間培養し、細胞を交換しました。細胞を回収し、細胞外マトリックス (ECM) 産生発現レベルを qRT-PCR で調べました。プライマー配列を表 1 に示した。上清を収集し、プロコラーゲン I 型 C-ペプチド ELISA (Takara、東京、日本) および MMP-1 ELISA (R&D systems、MN) で製造元のプロトコルに従って測定した。

皮膚の細胞外マトリックス (ECM) は、皮膚の形態や成長や弾力性などの機能にとって重要です [1]。コラーゲンは、体の機械的保護、皮膚の脱水の防止、弾力性の維持、組織の硬さ、皮膚のしわの最小化を担っています。エラスチンは、体組織の主要な構造タンパク質であり、皮膚の真皮の深層から表層にかけて厚さが減少する繊維状タンパク質です。エラスチンは強度と自然な弾力性を提供し、組織の修復に重要な役割を果たします [2]。幹細胞技術と化粧品のコラボレーションである機能的化粧品は、現在、化粧品業界で新たなトレンドとなっています。幹細胞は、自己複製が可能で、組織に多系統の分化可能な細胞を提供できる未成熟な組織前駆細胞の集団です。幹細胞の中で、間葉系幹細胞 (MSC) は、その実用性と安全性のために最も積極的に使用されています。間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、胎盤、臍帯血などのさまざまな組織から分離されます。MSC は、サイトカインと、上皮成長因子 (EGF) や塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) などのさまざまな成長因子を分泌します。これらは、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) のコラーゲン合成による皮膚の若返りと創傷治癒に重要であることがよく知られています [3e6]。最近、パラクリン効果が MSC の主要な作用メカニズムの 1 つとして評価されています [7]、皮膚の若返りのための成長因子におけるそれらの有益な役割にはさらなる研究が必要です [8]。臍帯血由来間葉系幹細胞 (UCB-MSC) は、さまざまな組織由来の MSC の中で最も原始的で最も若い細胞と考えられています。UCB-MSC は、他の MSC と比較してより高い含有量の創傷治癒因子を分泌します [9]。UCB-MSC は、線維芽細胞の移動、増殖、コラーゲン合成を促進します [10]。さらに、UCB-MSC 馴化培地は、皮下注射された動物を介して創傷閉鎖および再上皮化も促進します [11]。UCB-MSC の使用から得られるそのような利点から、幹細胞を使用した化粧品の開発が注目されています。特に、幹細胞の有効因子の浸透性を高めるための研究が最近行われています。脂質二重膜小胞システムは、皮膚への浸透性を高めるための最も一般的な戦略の 1 つです [12]。エクソソームは、細胞間コミュニケーションのメカニズムを備えた直径 30-100nm の小さな細胞外膜小胞です。エクソソームは、細胞間コミュニケーションのためのタンパク質と RNA を運ぶ最も広範なクラスの分泌膜小胞です [13-15]。エクソソームを介した細胞間コミュニケーションのいくつかのメカニズムが報告されています：(i) エクソソーム膜タンパク質と標的細胞上のそれらの受容体との間の相互作用、(ii) エクソソーム膜タンパク質と細胞に由来する可溶性フラグメント間の相互作用表面受容体、(iii) 標的細胞によるエクソソームの内容物の内在化 [16]。

馴化培地 (CM) の幹細胞に由来するエクソソームはナノサイズであり、皮膚表皮への浸透を介して再生効果を高める可能性があります [17]。



## 2.5. スクラッチアッセイ

7x10<sup>5</sup> 個の HDF を、ibidi Culture-Insert (No.81176, ibidi GmbH Munich, Germany) を使用して細胞培養システムに播種しました。このアプローチは、500 μm の厚さの分離壁を備えた 2 つの細胞培養リザーバーにより提供されます。細胞遊走の測定のために、シリコンインサートは 24 時間後に取り外されました。作成された間隙を洗浄し、各ウェルに USC-CM Exos (1x10<sup>9</sup> particles/ml) を含む新鮮な無血清培地を充填しました。0 日目と 4 日目に閉鎖エリアの画像を撮影し、InCuCyte ZOOM System (Essen BioScience) によって移動速度を測定しました。

## 2.6. USC-CM Exos のヒトの皮膚への浸透

腹部の皮膚サンプルは、Biopredic International (Rennes, France) を通じて健康なアフリカの女性ドナー (32 歳) から入手しました。皮膚サンプルを 4 ウェルプレートにセットし、皮膚培養培地 (Biopredic International) に浸し 37°C および 5% CO<sub>2</sub> の中で培養しました。USC-CM Exos は、製造元のプロトコルに従って Exo-Green (System Biosciences, Mountain View, CA) で蛍光標識されました。標識されたエクソソームは、マイクロピペットで皮膚に塗布されました。0 時間、3 時間および 18 時間で 4% パラホルムアルデヒドで皮膚を固定した。皮膚組織を OCT 化合物 (Tissue-Tek, Sakura, 日本) に包埋し、4 μm の切片に切断しました。これらの切片は、標準的なプロトコルに従ってヘマトキシリンおよびエオシンで染色されました。核は Hoechst33342 (1:1000, Molecular Probes) で染色されました。画像は、蛍光顕微鏡 (Nikon, 東京, 日本) で撮影した。

## 3. Result (結果)

### 3.1. ヒト臍帯血幹細胞由来培養上清エクソソーム (USC-CM Exos) の特性評価

USC-CM からエクソソームを分離しました。エクソソームの小胞の形態は、電子顕微鏡分析によって観察され、これらの粒子のほとんどの大きさは、50nm から 150nm の範囲でした (図 1A)。ELISA により、これらの粒子におけるエクソソームマーカー CD81 の発現が確認されました (図 1B)。さらに、NanoSight 分析を使用して、粒子サイズ分布、濃度、および動的追跡を測定しました (図 1C)。USC-CM Exos を、2つの異なる馴化培地 (脂肪由来幹細胞培養上清: AD-MSC-CM Exos, 線維芽細胞由来培養上清: HDF-CM Exos) に由来する各エクソソームと比較しました。平均粒子径は、それぞれ 120 nm (臍帯血由来)、230 nm (脂肪由来)、160nm (線維芽細胞由来) と報告されています。また、エクソソーム粒子は、それぞれ 1.23x10<sup>11</sup>±2.42x10<sup>9</sup>、1.09x10<sup>11</sup>±3.19x10<sup>9</sup>、および 7.03x10<sup>10</sup>±6.98x10<sup>9</sup> particles/ml と測定されました (表 2)。結果は、臍帯血由来 USC-CM からのエクソソームが正常によく分離され、定義されたエクソソームと一致していることが示されました。脂肪由来 AD-MSC-CM および線維芽細胞由来 HDF-CM もエクソソームを分泌できますが、臍帯血由来の粒子サイズが最も小さいという事が明らかとなった。

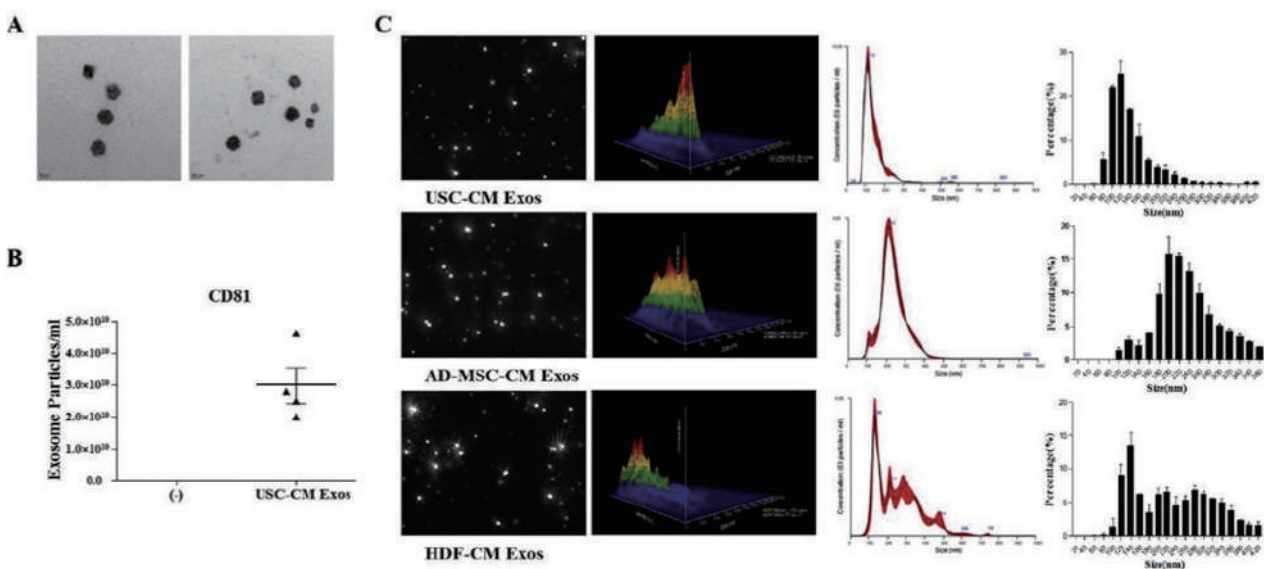


図 1. USC-CM の特性評価

(A) (A) 透過型電子顕微鏡による USC-CM Exos の形態学的分析 (scale bar = 50 nm, 100 nm)。 (B) ExoELISA によるエクソソーム内での CD81 発現の検出。 (C) エクソソームの特性は、NanoSight 分析によるエクソソームの特性評価。 Dynamic tracking video capture (Ci)、濃度分析 (C-ii)、サイズ分布 (C-iii)、USC-CM Exos、AD-MSC-CM Exos、HDF-CM Exos の粒子サイズ分布は、それぞれ 40~120 nm、60%の範囲は 80~230 nm、30%の範囲は 40~160 nm (C-iv)。

3.2. 臍帯血由来培養上清エクソソーム (USC-CM Exos) は成長因子の含有量が高い。

エクソソーム形態としての臍帯血由来培養上清 (USC-CM) における様々な成長因子の存在を決定するために、我々は、ヒト成長因子抗体アレイを使用し、USC-CM および USC-CM Exos における 41 の異なるサイトカインを分析しました。メンブレンには 41 個の成長因子と受容体に対する抗体が標識されており、左上隅に 4 つのポジティブコントロールと 4 つのネガティブコントロールがあります (図 2A と B、左)。ヒト成長因子抗体アレイの定量化の結果は、USC-CM と USC-CM Exos の両方が、EGF や bFGF などの皮膚の若返りに関連するタンパク質を有意に高濃度で含むことを示しました (図 2A および B、右)。この分析は、USC-CM が皮膚の若返りに関連するさまざまな成長因子と、エクソソームの形として USC-CM に存在するさまざまな成長因子の中で比較的大量の EGF を持っていることを示しました。さらに、USC-CM Exos を 2 つの異なる MSC-CM (AD-MSC-CM Exos、BM-MSC-CM Exos) に由来する各エクソソームと比較しました (図 S1、補足資料)。USC-CM Exos は、AD (脂肪) および BM (骨髄)-MSC-CM Exos と比較して、皮膚関連タンパク質を多く含んでいました。ヒト成長因子抗体アレイの結果の定量化は、USC-CM Exos が AD- および BM-MSC-CM Exos と比較して皮膚関連タンパク質を多く含んでいることを示しました。

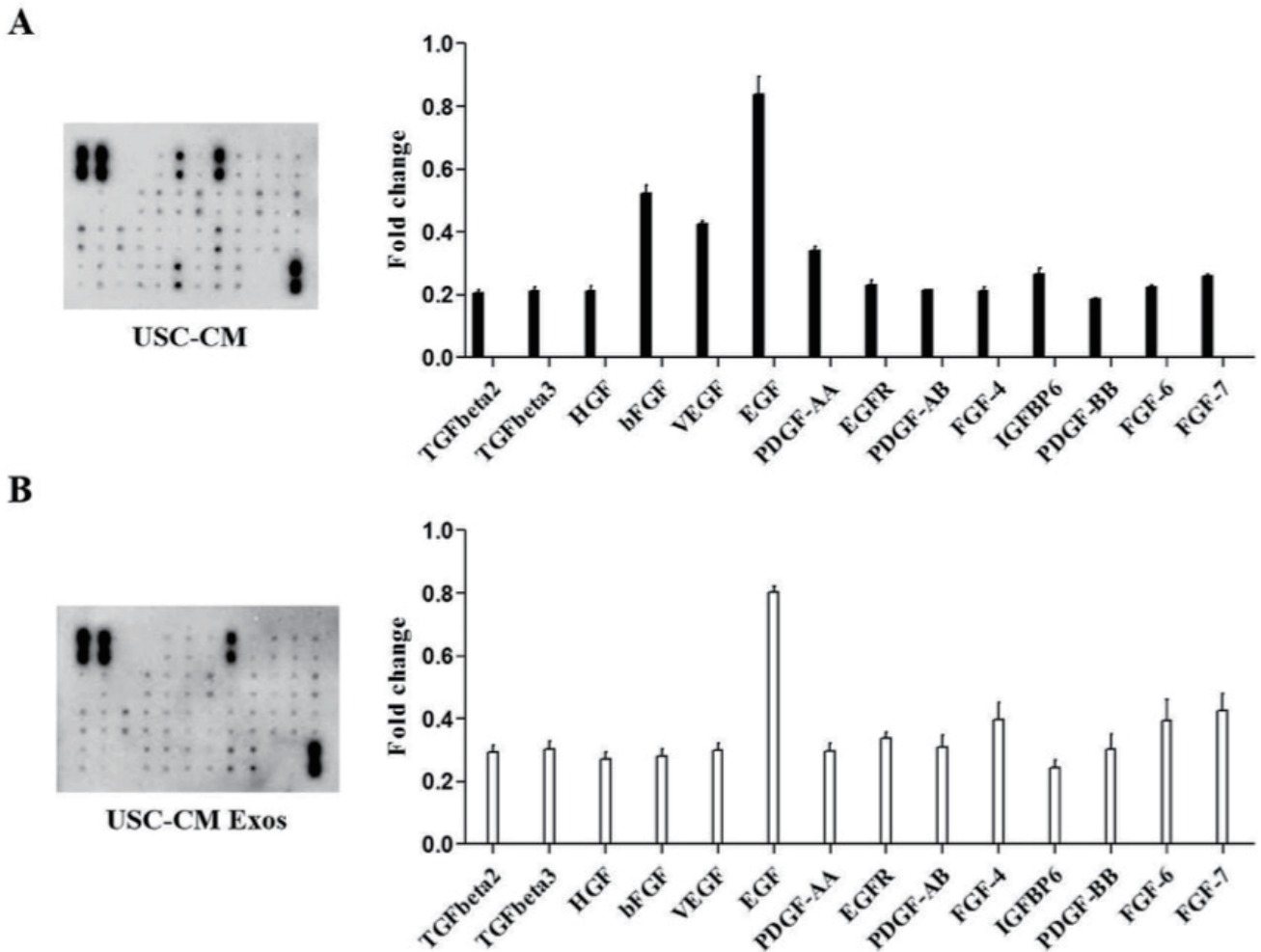


図 2 USC-CM エクソソームの定量解析

ヒト成長因子抗体アレイ (A) USC-CM (B) USC-CM Exos. 肌の若返りに関連するタンパク質の発現解析。

### 3.3. HDF による USC-CMExos の統合

エクソソームの細胞内輸送を調べるために、PKH26 蛍光細胞リンカーキットを使用してエクソソームを標識し、Exo-Glow キットを使用して内部エクソソームタンパク質を緑色で標識しました。HDF を USC-CMExos と 24 時間培養した後、USC-CM Exos の細胞内局在を蛍光顕微鏡を使用して分析し、HDF の核周辺領域で観察できました (図 3A)。この分析は、USC-CMExos と同様に内部エクソソームタンパク質が HDF と融合できることを示しました。

3.4. USC-CMExos は invitro で HDF の移行とコラーゲン合成を促進しました。

USC-CM Exos が成長とコラーゲン合成に及ぼす影響を調べるために、さまざまな濃度のエクソソーム (Exos1; 1108 粒子 / ml, Exos2; 1109 粒子 / ml) で 24 時間処理した HDF の ECM 遺伝子発現を評価しました。コラーゲンI、フィブロネクチン、エラスチンの遺伝子発現の結果は大幅に増加しました。したがって、エクソソームの最適濃度は Exos2 として決定されました (図 3B)。プロコラーゲン 1 型 C- ペプチドのタンパク質レベルは、対照群と比較して Exos2 群で有意に増加しました。MMP-1 タンパク質の発現は対照群と比較した Exos1 および 2 群 (図 3C)。さらに、USC-CMExos の HDF 成長能力を調査しました。USC-CM Exos (Exos2) が HDF の移行に及ぼす影響を判断するために、スクラッチアッセイを実行しました。0 日目と 4 日目の閉鎖エリアの画像を図 3D に示します。また、InCuCyteZOOM による自動生細胞イメージングを図 S2 に示します。移動速度は、InCuCyte ZOOM システムによってさまざまな時間に測定されました (図 3E)。続いて、USC-CM Exos では、コントロールと比較して移行率が一貫して増加しました (図 3D および E)。すべてのデータは、USC-CM Exos が HDF の移行、 invitro でのコラーゲン合成を促進したことを示しています。

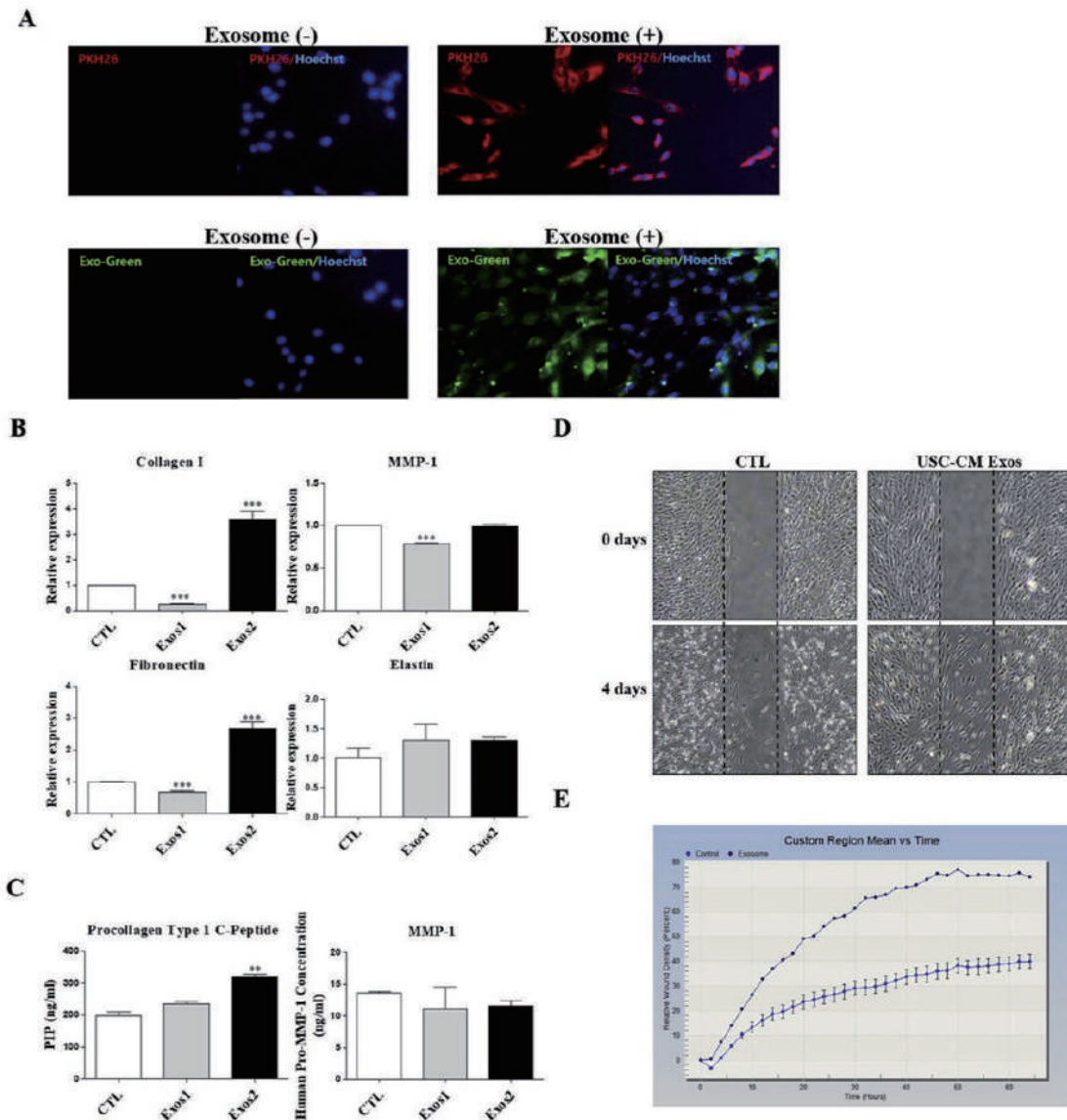


図 3.HDFs による USC-CM Exos の細胞内在化、および USC-CM Exos が促進する HDFs の移動、 invitro での ECM 遺伝子発現 (A) エクソソーム膜標識 PKH 26 が HDF (x400) に取り込まれました (上)。Exo-green で標識されたエクソソームタンパク質、HDF の核周辺領域 (x400) (下) (B) 異なる濃度のエクソソーム (CTL; DMEM のみ, Exos1; 1x108 particles / ml, Exos2; 1x109 particles / ml) で 24 時間処理された HDF の ECM 遺伝子発現 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001。 (C) 細胞外 (上清) コラーゲン含有量の ELISA 分析。プロコラーゲン I 型 C- ペプチド (左) および MMP-1 (右) ELISA (D) 1x109 particles/ ml USC-CM Exos で 4 日間処理した後の HDFs のスクラッチアッセイ。 (E) InCuCyteZOOM システムによる移動率測定。(Web バージョンの追加情報を参照してください。)



### 3.5. USC-CMExos のヒトの皮膚への浸透

ヒト腹部皮膚を介した USC-CMExos 透過を研究するために、エクソソームで処理されたヒト腹部皮膚の代表的な透過イメージングを、0 時間、3 時間、および 18 時間で観察しました。蛍光標識の退行のため、観察は 18 時間に制限されました。ヒトの腹部皮膚浸透アッセイは、組織学によって評価されました。H&E 染色では、皮膚層の角質層、表皮、真皮がよく観察されました。蛍光顕微鏡では、Exo-Green は 3 時間の曝露後に表皮の最外層に到達し (図 4A)、18 時間で徐々に表皮に到達し始めました。この分析は、USC-CM Exos が表皮に到達する可能性があり、USC-CMExos の吸収が時間の経過とともにヒトの皮膚で進行することを示唆しました

### 3.6. USC-CMExos は人間の皮膚のコラーゲン合成を促進しました。

qRT-PCR 分析を実施して、臍帯血幹細胞培養上清 USC の 3 日間の治療後のヒト皮膚におけるコラーゲン I (図 4B)、MMP-1 (図 4C)、フィブロネクチン (図 4D) およびエラスチン (図 4E) の発現を USC-CM および USC-CMExos で評価しました。コラーゲン I とエラスチンの発現は、USC-CM と USC-CMExos 治療グループの両方で有意に増加しました。特に、これらの遺伝子の発現は、USC-CM と比較して USC-CMExos 治療群で高かった。

さらに、MMP-1 は USC-CMExos 治療群で対照群と比較して低く発現しました。したがって、USC-CM Exos はヒトの皮膚に浸透し、3 日間の治療後にコラーゲン I とエラスチンの発現を促進できることが示唆されています。

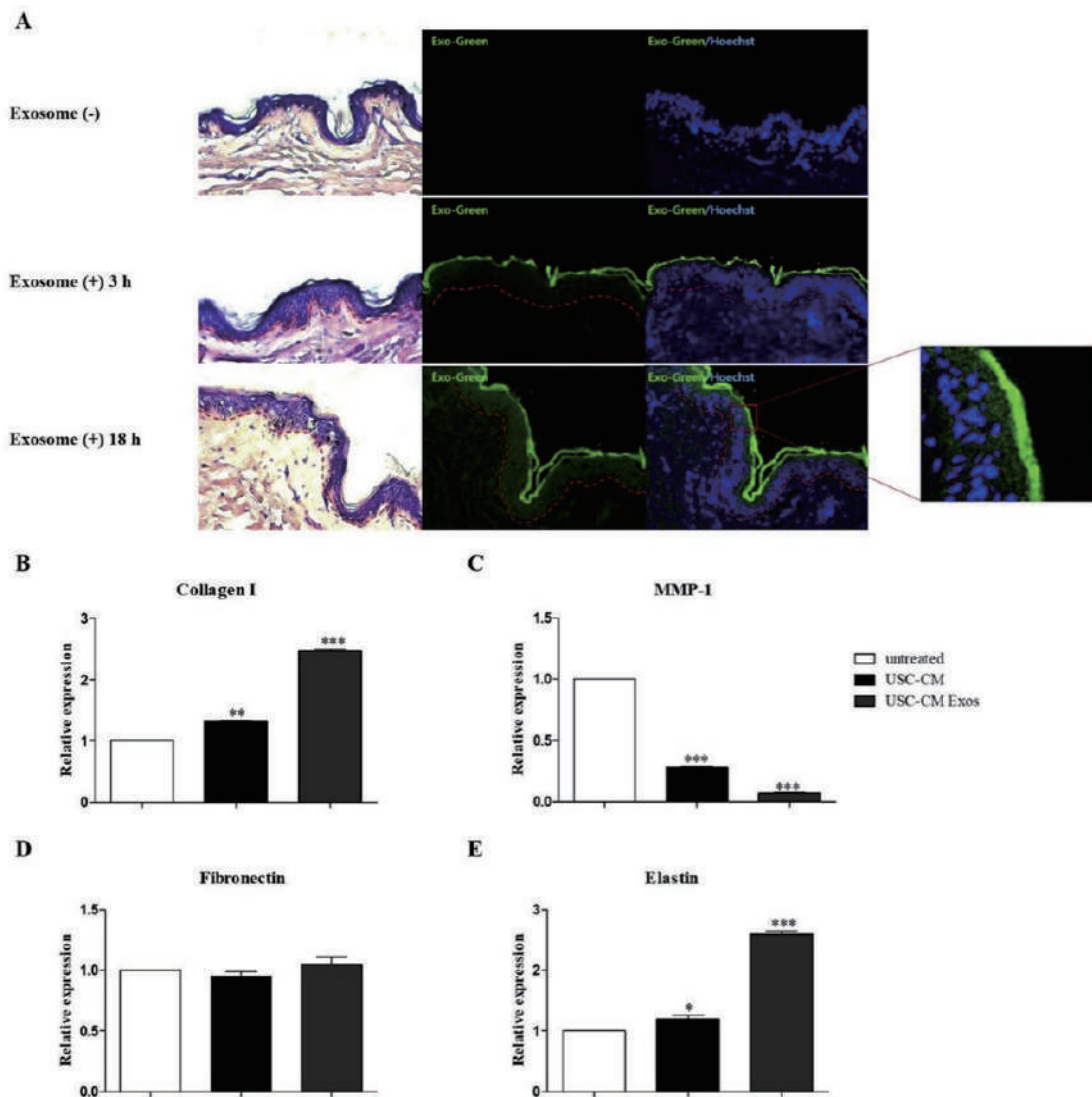


図 4. USC-CM Exos のヒトの皮膚浸透、および USC-CM Exos は、ヒトの皮膚におけるコラーゲン発現を促進しました。

(A) USC-CM Exo で処理した組織サンプルを固定し、H&E および蛍光色素で染色しました。ヒトの皮膚組織は、0 時間、3 時間、および 18 時間 (x200) に蛍光顕微鏡で観察されました。USC-CM および USC-CM Exos 処理の 3 日後に組織サンプルを収集しました。コラーゲン I (B)、MMP-1 (C)、フィブロネクチン (D) エラスチン (E) の mRNA 発現が観察されました。USC-CM および USC-CMExos で処理したサンプルでは、未処理のサンプルと比較して、コラーゲン I およびエラスチンの発現は増加しましたが、MMP-1 の発現は減少しました。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001。

#### 4. Discussion (考察)

本論文では、HDFの移動、ECMの生成、表皮へのエクソソームの浸透を介した皮膚の若返り効果に関して、ヒトの皮膚とヒトの線維芽細胞における USC-CM および USC-CM 由来のエクソソームの機能的役割を調べました。一般的に引用されているヒト MSC の中で、USC-CM は最も多くの成長因子を含み、USC-CM Exos の浸透は、ヒトの皮膚実験で立証されました。

幹細胞治療は、損傷した組織を修復し、皮膚の状態を若返らせるための安全で実用的かつ効果的な方法です。幹細胞によってもたらされる損傷の機能改善と弱毒化の多くは、有用な成長因子を含む MSC 由来の無細胞馴化培地で処理することによって繰り返し治療することが可能です。

細胞外小胞 (EV) は、MSC を含む多くの細胞型の培養上清から分離できます [21,22]。本研究では、USC-CM (臍帯血)、AD-MSC-CM (脂肪)、HDF-CM (線維芽細胞) からエクソソームを分離することに成功しました。さらに、USC-CM Exos の粒子サイズは、2つの異なる細胞 (AD-MSC および HDF) に由来する各エクソソームと比較して最小であることが確認されました。ヒトの皮膚を介したナノ粒子の浸透に関するいくつかの研究が報告されています [23,24]。この研究は、USC-CM Exos が最小のナノサイズのために、皮膚の浸透を促進する可能性があることを示唆しています。さらに、USC-CM Exos のサイズ分布は、AD-MSC および HDF に由来するエクソソームと比較して狭い範囲を示しました。これは、USC-CM Exos の粒子サイズが均一で、商業化に不可欠な標準化が容易であることを意味します。

USC-CM Exos 処理により、HDF でのコラーゲン、フィブロネクチン、エラスチンの生成が増加しました。これらは、ECM 構造の主軸となる重要な細胞成分です。コラーゲン I は ECM の主要なタンパク質の 1 つであり、エラスチンは皮膚の弾力性にとって極めて重要です [25]。それらの移動、増殖、コラーゲン合成は、肌の若返りの質にとって重要です。MMP-1 はコラーゲナーゼとして機能し、I、II、および III の間質コラーゲンを分解する分泌酵素をコードします [26]。USC-CM および USC-CM Exo で処理された HDF では、MMP-1 の生成が大幅に減少しました。これは、USC-CM が肌の若返り機能をより強力に持っていることを裏付けています。

エクソソームはその後、直接的な膜融合、エンドサイトーシス、または細胞型特異的な食作用を介して他の細胞によって内在化される可能性があります [17、27、28]。USC-CM Exos が HDF に取り込まれ、in vitro での成長と移行が促進されることが明らかとなりました。この後者の発見は、MSC エクソソーム処理後の HDF の移行を示すいくつかの報告と一致しています。さらに、USC-CM Exos による浸透の有意な増加が、皮膚全体、角質層、表皮で観察されました。まとめると、局所治療でヒトの皮膚に浸潤した USC-CM Exos と USC-CM は、コラーゲン I とエラスチンの産生を増強するが、ex vivo のヒトの皮膚では MMP-1 産生を減少させることが証明されました。これらは、USC-CM 由来のエクソソームを含む化粧品がヒトの肌に効果的である理由の 1 つです。

要約すると、USC-CM の有効な因子は、エクソソームでカプセル化され、ヒトの皮膚に浸透する可能性があります。これらの発見は、エクソソーム形態としての USC-CM が、皮膚再生材料、およびヒトの皮膚の若返りに重要な HDF における ECM タンパク質の成長と分泌を刺激する重要な因子に応用できることを示しました。





## Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin



Yoon-Jin Kim<sup>a</sup>, Sae mi Yoo<sup>a</sup>, Hwan Hee Park<sup>a</sup>, Hye Jin Lim<sup>a</sup>, Yu-Lee Kim<sup>a</sup>,  
Seunghee Lee<sup>a</sup>, Kwang-Won Seo<sup>a,\*</sup>, Kyung-Sun Kang<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Stem Cells and Regenerative Bioengineering Institute, Kangstem Biotech CO., LTD., 2nd Floor, Biotechnology Center, #81 Seoul National University Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, South Korea

<sup>b</sup> Adult Stem Cell Research Center, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, South Korea

### article info

#### Article history:

Received 5 September 2017

Accepted 12 September 2017

Available online 14 September 2017

#### Keywords:

Conditioned media from hUCB-MSCs

USC-CM

Exosomes

Skin permeation

Cosmetics

### abstract

Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) play an important role in cutaneous wound healing, and recent studies suggested that MSC-derived exosomes activate several signaling pathways, which are conducive in wound healing and cell growth. In this study, we investigated the roles of exosomes that are derived from USC-CM (USC-CM Exos) in cutaneous collagen synthesis and permeation. We found that USC-CM has various growth factors associated with skin rejuvenation. Our *in vitro* results showed that USC-CM Exos integrate in Human Dermal Fibroblasts (HDFs) and consequently promote cell migration and collagen synthesis of HDFs. Moreover, we evaluated skin permeation of USC-CM Exos by using human skin tissues. Results showed that Exo-Green labeled USC-CM Exos approached the outermost layer of the epidermis after 3 h and gradually approached the epidermis after 18 h. Moreover, increased expressions of Collagen I and Elastin were found after 3 days of treatment on human skin. The results showed that USC-CM Exos is absorbed into human skin, it promotes Collagen I and Elastin synthesis in the skin, which are essential to skin rejuvenation and shows the potential of USC-CM integration with the cosmetics or therapeutics.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The skin Extracellular Matrix (ECM) is crucial for skin morphology and functions such as that of growth and elasticity [1]. Collagen is responsible for mechanical protection of the body, prevention of the skin dehydration, maintenance of elasticity, firmness of the tissues and minimization of the skin wrinkles. Elastin is a major structural protein of the body tissues and a fibrous protein that is reduced in thickness from deeper to superficial layers of the skin. Elastin provides strength, natural elasticity, and plays an important role in tissue reparation [2].

Functional cosmetics, the collaboration of stem cell technology with cosmetics, are now emerging trend in the cosmetics industry. Stem cells are a population of immature tissue precursor cells capable of self-renewal and provision of multi-lineage differentiable cells for tissues. Among the stem cells, Mesenchymal Stem

Cells (MSCs) are used most actively because of their feasibility and safety. MSCs are isolated from various tissues including bone marrow, adipose tissues, placenta and umbilical cord blood. MSCs secrete cytokines and various growth factor such as Epithelial Growth Factor (EGF) and Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), which are well known to be important for skin rejuvenation and wound healing by collagen synthesis of Human Dermal Fibroblasts (HDFs) [3–6]. Recently, paracrine effects are evaluated as one of the main mechanisms of action in MSCs [7], but their beneficial roles in growth factors for skin rejuvenation require further studies [8].

Umbilical Cord Blood Derived Mesenchymal Stem Cells (UCB-MSCs) are considered as the most primitive and youngest cells among various tissues-derived MSCs. UCB-MSCs secrete higher content of wound healing factors, compared to other MSCs [9]. UCB-MSCs promote migration, proliferation and collagen synthesis of fibroblasts [10]. In addition, UCB-MSCs conditioned media also promote wound closing and re-epithelialization via animals subcutaneous injected [11]. Due to such benefits derived from the usage of UCB-MSCs, the development of cosmetic products using stem cells are highlighted. In particular, the studies to enhance

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [kwseo@kangstem.com](mailto:kwseo@kangstem.com) (K.-W. Seo), [kangpub@snu.ac.kr](mailto:kangpub@snu.ac.kr) (K.-S. Kang).

penetrability of effective factors of stem cells are recently carried out.

Bilayer vesicle systems are one of the most popular strategies to increase penetrability through the skin [12]. Exosomes are small extracellular membrane vesicles with 30–100 nm in diameter with a mechanism of cell-to-cell communication. Exosomes are the most extensive class of secreted membrane vesicles that carry proteins and RNAs for intercellular communication [13–15]. A few mechanisms of exosome-mediated cell-to-cell communication have been reported: (i) interaction between exosome membrane proteins and their receptors on target cells, (ii) interaction between soluble fragments which are derived from exosome membrane proteins and cell surface receptors, (iii) internalization of contents of exosomes by target cells [16].

Exosomes derived from stem cells in conditioned media (CM) are nano-sized and may make the regeneration effect higher via penetration into the skin epidermis [17]. MSC-derived exosomes have been found to play significant roles in cutaneous wound healing via animals injected locally or intravenously [18,19]. However, it is still unclear if MSC-derived exosomes can enhance skin regeneration via human applied. In this study, we investigated if USC-CM derived exosome (USC-CM Exos) could be internalized by HDFs and promote HDFs migration and collagen synthesis, which can benefit skin regeneration. This study confirmed that USC-CM Exos can promote collagen synthesis via human skin permeation. These data present strong in vitro and ex vivo evidence that UCB-MSCs-derived exosomes such as USC-CM Exos have potentials for development and application in cosmetics.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of USC-CM

UCB-MSCs were isolated from Human umbilical cord bloods approved by the FORMIZ WOMEN'S Hospital (IRB No.219255-201305-BR-001, Seoul, Korea) with previously described method [20]. UCB-MSCs were cultured and expanded up to passage 5 at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in KSB-3 (Irvine scientific, Santa Ana, CA) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). UCB-MSCs (1.89 × 10<sup>5</sup> cells/Flask) were seeded in T-25 flask and cultured for 48 h in KSB-3 with 10% FBS. After PBS washing twice, the culture medium was changed to KSB-2 media; DMEM (Gibco) containing EGF (10 ng/ml) and bFGF (10 ng/ml), followed by incubation period of 96 h. Conditioned media of UCB-MSCs (USC-CM) were collected, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, and finally filtered using a 0.22 μm syringe filter.

### 2.2. Isolation and identification of exosomes derived from USC-CM

Exosomes were isolated from USC-CM using exoEasy Maxi kit (QIAGEN). The method is being distributed by QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) as exoEasy Maxi Kit, and the standard protocol is described in the exoEasy Handbook. Brie fly, prefiltered USC-CM was mixed 1:1 with 2x binding buffer (XBP) and added to the exoEasy membrane affinity column to bind the exosomes to the membrane. After centrifugation, the flow-through was discarded and wash buffer (XWP) was added to the column to wash off non-specifically retained material. After another centrifugation and discarding of the flow-through, the vesicles were eluted by adding elution buffer to the spin column, and the eluate was collected by centrifugation. This procedure allows concentrating the exosome from 15 ml USC-CM into a final volume of 200 μl of elution buffer. The particle number of exosomes was determined by using a CD81 ExoELISA kit (System Biosciences, Mountain View, CA) following the instructions provided. Brie fly, a standard curve was prepared by

serially diluting the ExoELISA protein standard with exosome binding buffer, and results were measured at 450 nm using a microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland). The collected exosomes morphologies were observed by 100 kv Transmission Electron Microscopy (TEM). The size, concentration and particle size distribution of exosomes were identified by NanoSight LM10 (Malvern, UK) and Nanoparticle Tracking Analysis software version 3.0 (NanoSight).

### 2.3. Human growth factor antibody array

Human Growth Factor Antibody Array was performed as described in the [Supplementary Materials and Methods section](#).

### 2.4. Collagen synthesis of HDFs with exosomes stimulation

HDFs (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) were seeded in 6-well plates and cultured for 24 h in KSB-3 medium. After washing, different concentrations of USC-CM Exos (Exos1; 1 × 10<sup>8</sup> Particles/ml, Exos2; 1 × 10<sup>9</sup> Particles/ml) with serum-free culture medium (DMEM) were changed for additional 24 h culture, and cells were collected and extracellular matrix (ECM) production expression level was examined by qRT-PCR. The primer sequences were listed in [Table 1](#). The supernatants were collected and measured with Procollagen Type I C-peptide ELISA (Takara, Tokyo, Japan) and MMP-1 ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol.

### 2.5. Scratch assay

7 × 10<sup>5</sup> HDFs were seeded into the cell culture system by using the ibidi Culture-Insert (No. 81176, ibidi GmbH, Munich, Germany). This approach provides two cell culture reservoirs with a separation wall of 500 μm thick. For the measurement of cell migration, the silicon inserts were removed after 24 h. The gaps created were washed and each well was filled with fresh serum-free culture medium containing USC-CM Exos (1 × 10<sup>9</sup> Particles/ml). We took images of the closing area at 0 and 4 days, and measured rate of migration on different days by InCuCyte ZOOM System (Essen BioScience, Ann Arbor, MI).

### 2.6. Human skin permeation of USC-CM Exos

Abdominal skin samples were obtained from healthy female African donors (32 years of age) through Biopredic International (Rennes, France). The skin samples were set in a 4-well plate and dipped in Skin Culture Medium (Biopredic International) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. USC-CM Exos were fluorescently labeled with ExoGreen (System Biosciences, Mountain View, CA) according to the manufacturer's protocol. Labeled exosomes were applied with a micropipette on the skin. The skins fixed with 4%

Table 1  
Primers used in research.

Gene	Species	Primer
Collagen I	Human	F 5 <sup>′</sup> cacagaggtttcagtggttg-3 <sup>′</sup>
		R 5 <sup>′</sup> gcaccagtagcaccatcatttc-3 <sup>′</sup>
MMP-1	Human	F 5 <sup>′</sup> ttgagaaagccttccaactctg-3 <sup>′</sup>
		R 5 <sup>′</sup> ccgcaacacgatgtaagtgtga-3 <sup>′</sup>
Fibronectin	Human	F 5 <sup>′</sup> aagattggagagaagtgggacc-3 <sup>′</sup>
		R 5 <sup>′</sup> gagcaatggcaccgagata-3 <sup>′</sup>
Elastin	Human	F 5 <sup>′</sup> gggtgtgtcaccagaagca-3 <sup>′</sup>
		R 5 <sup>′</sup> caaccctgaagttaggaatgc-3 <sup>′</sup>
RPL13A	Human	F 5 <sup>′</sup> gcacgaccttgagggcagcc-3 <sup>′</sup>
		R 5 <sup>′</sup> catcgtggctaacaggctactg-3 <sup>′</sup>

paraformaldehyde at indicated time points 0 h, 3 h and 18 h. Skin tissues were embedded in OCT-compound (Tissue-Tek, Sakura, Japan) and were sectioned into 4- $\mu$ m sections. These sections were stained with hematoxylin and eosin according to standard protocols. The nuclei were stained with Hoechst33342 (1:1000, Molecular Probes). Images were sequentially acquired with fluorescent microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.7. Collagen synthesis of human skin with exosomes stimulation

As mentioned above, Human skin samples were cultured and divided into three groups: untreated group, USC-CM group, USC-CM Exos group. USC-CM and USC-CM Exos were topically applied twice a day with a micropipette on the skin for 3 days. After 3 days, skin tissues were collected for qRT-PCR analysis.

### 2.8. Statistical analysis

All data were shown as means  $\pm$  standard deviation (SD). The statistically significant differences between groups were assessed by t-test using GraphPad Prism 5 software. P values < 0.05 were considered significant. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.0001. The values are shown in the figures.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of USC-CM Exos

We isolated exosomes from USC-CM. The round vesicles morphologies of exosomes were observed by electron microscopic analysis, and the most of these particles yielded sample sizes ranging from 50 nm to 150 nm (Fig. 1A). The ELISA confirmed that the expression of exosome marker CD81 in these particles (Fig. 1B). Moreover, the particle size distribution, concentration and dynamic tracking were measured by using NanoSight analysis (Fig. 1C). We compared USC-CM Exos with each Exosomes derived from two

Table 2

Exosome particles were measured by NanoSight analysis.

	Exosome particles/ml
USC-CM Exos	$1.23 \times 10^{11} \pm 2.42 \times 10^9$
AD-MSC-CM Exos	$1.09 \times 10^{11} \pm 3.19 \times 10^9$
HDF-CM Exos	$7.03 \times 10^{10} \pm 6.98 \times 10^9$

different conditioned media (AD-MSC-CM Exos, HDF-CM Exos). Mean particle diameters were reported as 120 nm, 230 nm and 160 nm, respectively. Also, exosome particles were measured as  $1.23 \times 10^{11} \pm 2.42 \times 10^9$ ,  $1.09 \times 10^{11} \pm 3.19 \times 10^9$  and  $7.03 \times 10^{10} \pm 6.98 \times 10^9$  Particles/ml, respectively (Table 2). The results indicated that exosomes from USC-CM were successfully isolated and consistent with the defined exosomes. AD-MSC-CM and HDF-CM also can secrete exosomes, but the particle sizes of USC-CM Exos were smaller than those of AD-MSC-CM Exos and HDF-CM Exos.

### 3.2. USC-CM and USC-CM Exos contained high amount of growth factors

In order to determine the existence of various growth factors in USC-CM as exosome forms, we analyzed 41 different cytokines in USC-CM and USC-CM Exos using the human growth factor antibody array. The membrane was printed with antibodies for 41 growth factors and receptors, with four positive and four negative controls in the upper left corner (Fig. 2A and B, left). Results from quantification of the human growth factor antibody array showed that both USC-CM and USC-CM Exos contained significantly higher concentrations of proteins associated with skin rejuvenation such as EGF and bFGF (Fig. 2A and B, right). This analysis demonstrated that USC-CM has various growth factors associated with skin rejuvenation and relatively high amount of EGF among various growth factors that exist in USC-CM as exosome forms. In addition, we compared USC-CM Exos with each exosomes derived from two

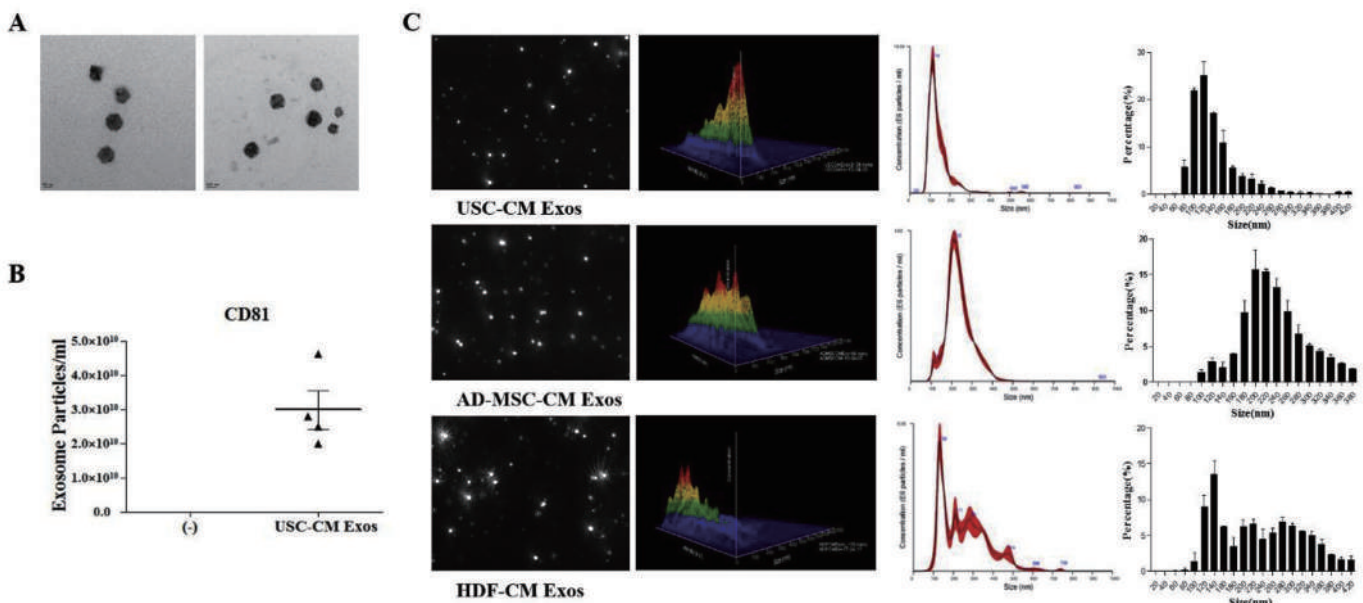


Fig. 1. Characterization of USC-CM Exos.

(A) Morphologic analysis of USC-CM Exos by transmission electron microscopy (scale bar =  $\frac{1}{4}$  50 nm, 100 nm). (B) Detection of CD81 expression in exosomes by ExoELISA. (C) Characterizations of exosomes were measured by NanoSight analysis. Dynamic tracking video capture (C-i), Concentration analysis (C-ii), Size distribution (C-iii), Particles size distribution of USC-CM Exos, AD-MSC-CM Exos and HDF-CM Exos displayed about 60% range from 40 to 120 nm, 60% range from 80 to 230 nm and 30% range from 40 to 160 nm, respectively (C-iv).

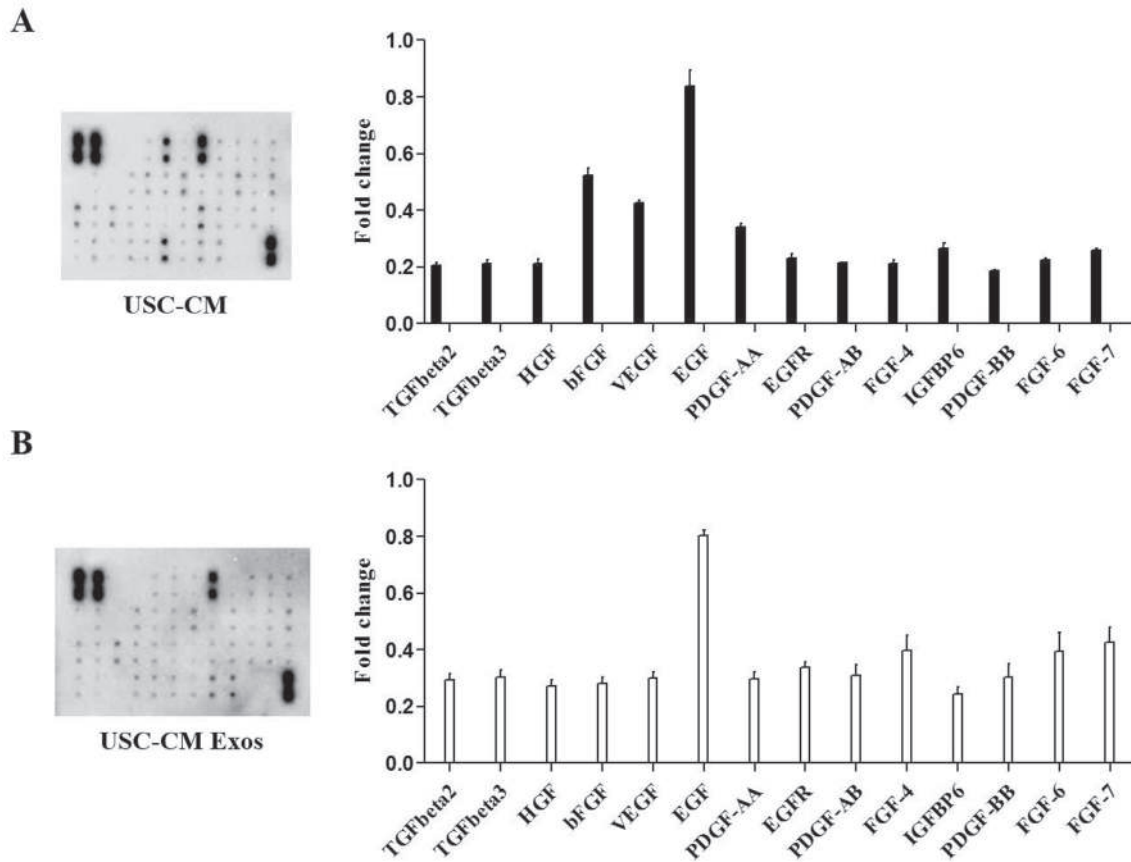


Fig. 2. Quantitative Analysis of USC-CM Exos.

Human growth factor antibody array analysis of USC-CM (A) and USC-CM Exos (B). Densitometric analysis of proteins associated with skin rejuvenation

different MSC-CM (AD-MSC-CM Exos, BM-MSC-CM Exos) ( Fig. S1, Supplementary material). USC-CM Exos strongly contained skin-related proteins compared with AD- and BM-MSC-CM Exos. Quantification of the human growth factor antibody array results showed that USC-CM Exos strongly contained skin-related proteins compared with AD- and BM-MSC-CM Exos.

### 3.3. Integration of USC-CM Exos by HDFs

To examine the exosome intracellular trafficking, we used the PKH26 Fluorescent Cell Linker Kits to label the exosomes and the Exo-Glow kits for internal exosome proteins with green. After incubating HDFs with USC-CM Exos for 24 h, the cellular localization of USC-CM Exos were analyzed using fluorescence microscopy and observed in the perinuclear region of HDFs ( Fig. 3A). This analysis demonstrated that internal exosome proteins as well as USC-CM Exos can be integrated with HDFs.

### 3.4. USC-CM Exos promoted HDFs migration and collagen synthesis in vitro

In order to determine the effects of USC-CM Exos on growth and collagen synthesis, we evaluated the ECM gene expression of HDFs treated with various concentrations of exosomes (Exos1;  $1 \times 10^8$  Particles/ml, Exos2;  $1 \times 10^9$  Particles/ml) for 24 h. The results of Collagen I, Fibronectin and Elastin gene expression were significantly increased. Therefore, the optimal concentration of exosomes was decided as Exos2 ( Fig. 3B). The protein levels of Procollagen Type 1 C-peptide were significantly increased in Exos2 group compared to control group. MMP-1 protein expression decreased in

Exos1 and 2 group compared to control group ( Fig. 3C). We further investigated HDFs growth ability of USC-CM Exos. To determine the effect of USC-CM Exos (Exos2) on migration of HDFs, scratch assay was performed. Images of the closing area at 0 and 4 days is shown in Fig. 3D. In addition, automated live cell imaging with InCuCyte ZOOM is shown in Fig. S2. The migration rate was measured on different times by InCuCyte ZOOM System ( Fig. 3E). Consecutively, migration rate consistently increased in USC-CM Exos compared to control ( Fig. 3D and E). All data demonstrate that USC-CM Exos promoted HDFs migration, collagen synthesis in vitro.

### 3.5. Human skin permeation of USC-CM Exos

To study the USC-CM Exos permeation through human abdominal skin, representative permeation imaging of human abdomen skin treated with exosomes were collected at indicated time points 0 h, 3 h and 18 h. Since obvious fluorescent images could not last long times, observation was limited on 18 h. Human abdominal skin penetration assays were evaluated by histology. In H&E staining, stratum corneum, epidermis and dermis in skin layers were well observed. In fluorescent microscope, Exo-Green reached the outermost layer of the epidermis after 3 h of exposure ( Fig. 4A) and that started reaching epidermis progressively at 18 h. This analysis suggested that USC-CM Exos could be reached epidermis and the absorption of USC-CM Exos progressed with the course of time on human skin.

### 3.6. USC-CM Exos promoted collagen synthesis in human skin

qRT-PCR analysis was performed to assess Collagen I ( Fig. 4B),



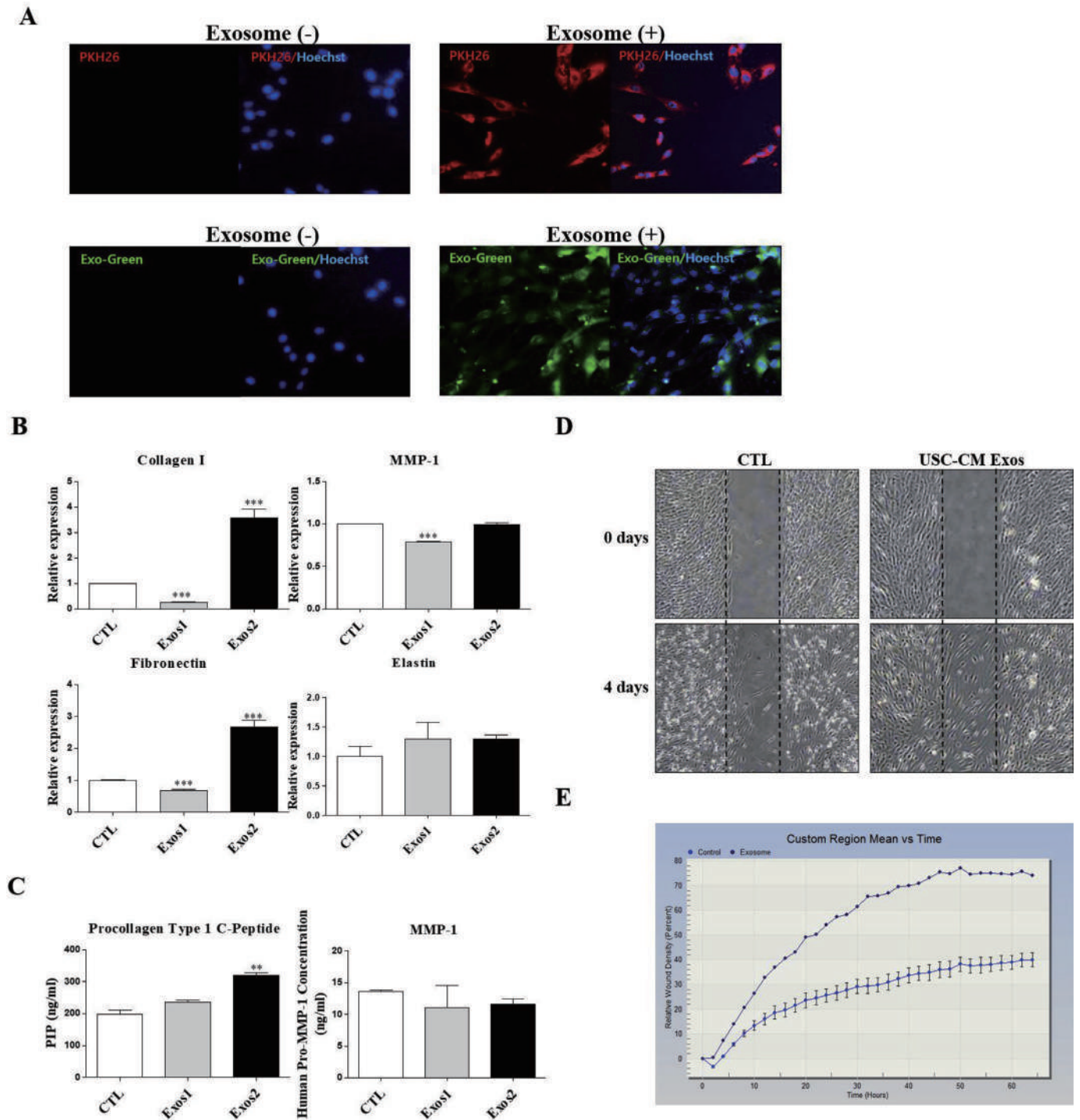


Fig. 3. Cellular internalization of USC-CM Exos by HDFs, and USC-CM Exos promoted HDFs migration, ECM gene expression in vitro.

(A) Exosome membrane-labeled PKH 26 was integrated in HDFs (x400) (upper). Exosome protein-labeled EXO-green was perinuclear region of HDFs (x400) (lower). (B) ECM gene expression of HDFs treated with different concentrations of exosomes (CTL; DMEM only, Exos1;  $1 \times 10^8$  Particles/ml, Exos2;  $1 \times 10^9$  Particles/ml) for 24 h\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (C) Extracellular (supernatant) collagen content was determined by means of Procollagen Type I C-peptide (left) and MMP-1 (right) ELISA. (D) Scratch assay of HDFs following treated with  $1 \times 10^9$  Particles/ml USC-CM Exos for 4 days. (E) The migration rate on different times by InCuCyte ZOOM System. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

MMP-1 (Fig. 4C), Fibronectin (Fig. 4D) and Elastin (Fig. 4E) expressions in human skin after 3 days treatment of USC-CM and USC-CM Exos. The expression of Collagen I and Elastin were significantly increased in both of USC-CM and USC-CM Exos treatment groups. Particularly, the expression of these genes were higher in USC-CM Exos treatment groups comparing to USC-CM.

Furthermore, MMP-1 was expressed lower in USC-CM Exos treatment group compared to that of control group. Therefore, it is suggested that USC-CM Exos can penetrate human skin and can promote the expression of Collagen I and Elastin after 3 days treatment.

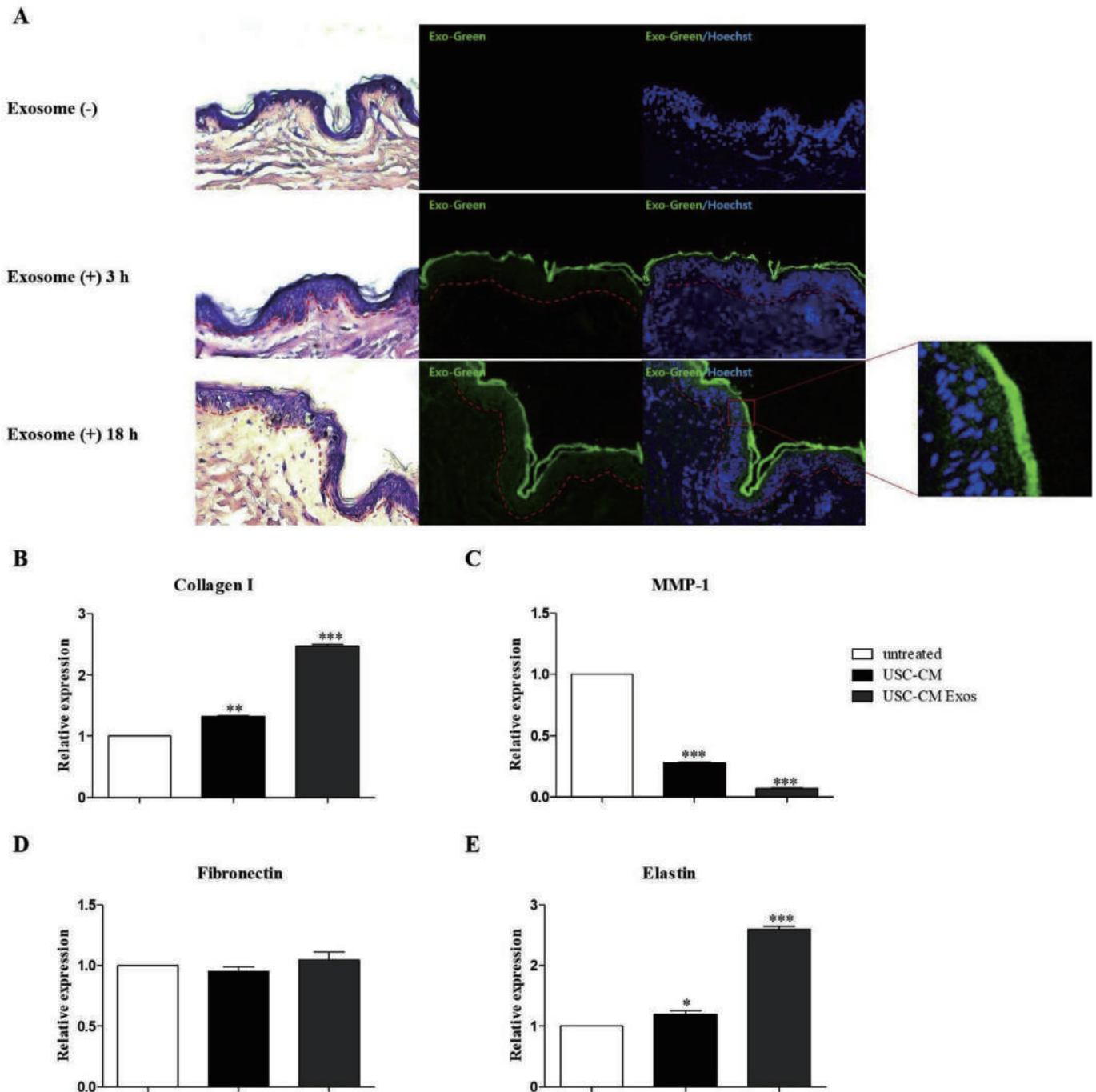


Fig. 4. Human skin permeation of USC-CM Exos, and USC-CM Exos promoted collagen expression in human skin. (A) Tissue samples treated with USC-CM Exo were fixed and stained with H&E and fluorescent dye. Human skin tissues were observed with fluorescence microscopy on 0 h, 3 h and 18 h (x200). Tissue samples were collected at 3 days after USC-CM and USC-CM Exos treatment. The Collagen I (B), MMP-1 (C), Fibronectin (D) and Elastin (E) mRNA expression were observed. The expressions of Collagen I and Elastin were increased but MMP-1 expression was decreased in USC-CM and USC-CM Exos treated samples compared those of untreated samples. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4. Discussion

In this paper, we tested functional roles of USC-CM and USC-CM derived exosomes in human skin and human fibroblast in respect to the skin rejuvenation effect via HDFs migration, ECM production and exosome penetration to the epidermis. Among popularly cited human MSCs, USC-CM contained the highest amount of growth factors and the penetration of USC-CM Exos was proposed when ectopically treated to the human skin.

Stem cell therapy is a safe, practical, and effective source for repairing the damaged tissue and rejuvenating the skin conditions. Much of the functional improvement and attenuation of the injury afforded by stem cells can be repeated by treatment with cell-free conditioned media derived from MSCs, which contain the useful growth factors.

Extracellular vesicles (EVs) can be isolated from cultured supernatants of many cell types including MSCs [21,22]. In the present study, we successfully isolated exosomes from USC-CM, AD-MSC-

CM and HDF-CM. Moreover, we observed that the particle size of USC-CM Exos was the smallest compared with each exosomes derived from two different cells (AD-MSK and HDFs). Several studies about permeation of nanoparticles through human skin have been reported [23,24]. This research suggests that USC-CM Exos could enhance skin permeation by reason of the smallest nano-sized. Moreover, size-distribution of USC-CM Exos showed narrower ranges compared to the exosomes derived from AD-MSK and HDFs, which means USC-CM Exos is unique and easy to standardization that is critical to commercialization.

USC-CM Exos treatment increased the production of Collagens, Fibronectin and Elastin in HDFs, which are the key cell responsible for ECM structure. Collagen I is one of main proteins of ECM and Elastin is pivotal to skin elasticity [25]. Their migration, proliferation and collagen synthesis are important for the quality of skin rejuvenation. MMP-1 works as a collagenase and encodes a secreted enzyme that breaks down the I, II, and III interstitial Collagens [26]. The production of MMP-1 was decreased in USC-CM and USC-CM Exo treated HDFs significantly, which supported that USC-CM had skin rejuvenation function more strongly.

Exosomes may subsequently be internalized by other cells via direct membrane fusion, endocytosis or cell-type specific phagocytosis [17,27,28]. We found that USC-CM Exos were uptaken by HDFs and enhanced the growth and migration in vitro. This latter finding is in line with several reports demonstrating HDFs migration after MSC exosomes treatment. Furthermore, we observed a significant increase of permeation with USC-CM Exos in whole skin as well as stratum corneum and epidermis. Taken together, USC-CM Exos and USC-CM in filtrated to human skin in topical treatment were proved to enhance the production of Collagen I and Elastin, but decreased the MMP-1 production in ex vivo human skin. These are one of the demonstration why cosmetics that contain exosomes derived from USC-CM are effective to human skin.

In summary, the effective factors of USC-CM can be encapsulated with exosomes and penetrate the human skin. These findings suggest that USC-CM as exosome forms can be used for skin-regeneration materials and a key factor that stimulates growth and secretion of ECM proteins in HDFs, which are important to human skin rejuvenation.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.056>.

#### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.056>.

#### References

- [1] T. Fulop, A. Khalil, A. Larbi, The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases, *Pathol. Biol.* 60 (2012) 28e 33.
- [2] M. Udompataikul, P. Sripiroj, P. Palungwachira, An oral nutraceutical containing antioxidants, minerals and glycosaminoglycans improves skin roughness and fine wrinkles, *Int. J. Cosmet. Sci.* 31 (2009) 427 e 435.
- [3] W.S. Kim, B.S. Park, J.H. Sung, J.M. Yang, S.B. Park, S.J. Kwak, J.S. Park, Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts, *J. Dermatol. Sci.* 48 (2007) 15 e 24.
- [4] L.Y. Liu, Y.H. Yu, Y.S. Hou, J.K. Chai, H.J. Duan, W.L. Chu, H.J. Zhang, Q. Hu, J.D. Du, Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats, *PLoS One* 9 (2014).
- [5] W.S. Kim, B.S. Park, S.H. Park, H.K. Kim, J.H. Sung, Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors, *J. Dermatol. Sci.* 53 (2009) 96 e 102.
- [6] B.S. Yoon, J.H. Moon, E.K. Jun, J. Kim, I. Maeng, J.S. Kim, J.H. Lee, C.S. Baik, A. Kim, K.S. Cho, J.H. Lee, H.H. Lee, K.Y. Whang, S. You, Secretory proteins and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.* 19 (2010) 887 e 902.
- [7] N. Heldring, I. Mager, M.J.A. Wood, K. Le Blanc, S.E.L. Andaloussi, Therapeutic potential of multipotent mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles, *Hum. Gene Ther.* 26 (2015) 506 e 517.
- [8] S. Fabi, H. Sundaram, The potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation, *Facial Plast. Surg.* 30 (2014) 157 e 171.
- [9] H. Doi, Y. Kitajima, L. Luo, C. Yan, S. Tateishi, Y. Ono, Y. Urata, S. Goto, R. Mori, H. Masuzaki, I. Shimokawa, A. Hirano, T.S. Li, Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing, *Sci. Rep.* 6 (2016).
- [10] G.X. Luo, W.G. Cheng, W.F. He, X.J. Wang, J.L. Tan, M. Fitzgerald, X.C. Li, J. Wu, Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood, *Wound Repair Regen.* 18 (2010) 506 e 513.
- [11] J. Kim, J.H. Lee, S.M. Yeo, H.M. Chung, J.I. Chae, Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cells that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing, *Vitro Cell. Dev. Biology-Animal* 50 (2014) 146 e 154.
- [12] S. Arora, H.S. Lamba, R. Tiwari, Dermal delivery of drugs using different vesicular carriers: a comparative review, *Asian J. Pharm.* 6 (2012) 237 e 244.
- [13] C. Bang, T. Thum, Exosomes: new players in cell-cell communication, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 2060 e 2064.
- [14] G. Camussi, M.C. Deregibus, S. Bruno, V. Cantaluppi, L. Biancone, Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication, *Kidney Int.* 78 (2010) 838 e 848.
- [15] J.S. Schorey, S. Bhatnagar, Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology, *Traffic* 9 (2008) 871 e 881.
- [16] L. Urbanelli, A. Magini, S. Buratta, A. Brozzi, K. Sagini, A. Polchi, B. Tancini, C. Emiliani, Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate, *Genes* 4 (2013) 152 e 170.
- [17] D. Feng, W.L. Zhao, Y.Y. Ye, X.C. Bai, R.Q. Liu, L.F. Chang, Q. Zhou, S.F. Sui, Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis, *Traffic* 11 (2010) 675 e 687.
- [18] L. Hu, J. Wang, X. Zhou, Z.H. Xiong, J.J. Zhao, R. Yu, F. Huang, H.D. Zhang, L.L. Chen, Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts, *Sci. Rep.* 6 (2016).
- [19] B. Zhang, X.D. Wu, X. Zhang, Y.X. Sun, Y.M. Yan, H. Shi, Y.H. Zhu, L.J. Wu, Z.J. Pan, W. Zhu, H. Qian, W.R. Xu, Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-Catenin pathway, *Stem Cells Transl. Med.* 4 (2015) 513 e 522.
- [20] K.W. Seo, S.R. Lee, D.R. Bhandari, K.H. Roh, S.B. Park, A.Y. So, J.W. Jung, M.S. Seo, S.K. Kang, Y.S. Lee, K.S. Kang, OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB-MSCs), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009) 120 e 125.
- [21] R.C. Lai, F. Arslan, M.M. Lee, S.K. Sze, A. Choo, T.S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C.N. Lee, R.M. El Oakley, G. Pasterkamp, D.P.V. de Kleijn, S.K. Lim, Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury (vol 4, pg 214, 2010), *Stem Cell Res.* 5 (2010) 170 e 171.
- [22] G. van Niel, I. Porto-Carreiro, S. Simoes, G. Raposo, Exosomes: a common pathway for a specialized function, *J. Biochem.* 140 (2006) 13 e 21.
- [23] H.I. Labouta, L.K. El-Khordagui, T. Kraus, M. Schneider, Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin, *Nanoscale* 3 (2011) 4989 e 4999.
- [24] T.W. Prow, J.E. Grice, L.L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E.M.T. Wurm, C. Yoong, T.A. Robertson, H.P. Soyer, M.S. Roberts, Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 470 e 491.
- [25] A. Byron, J.D. Humphries, M.J. Humphries, Defining the extracellular matrix using proteomics, *Int. J. Exp. Pathol.* 94 (2013) 75 e 92.
- [26] C. Tallant, A. Marrero, F.X. Gomis-Ruth, Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains, *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Res.* 1803 (2010) 20 e 28.
- [27] A.E. Morelli, A.T. Larregina, W.J. Shufesky, M.L.G. Sullivan, D.B. Stolz, G.D. Papworth, A.F. Zahorchak, A.J. Logar, Z.L. Wang, S.C. Watkins, L.D. Faló, A.W. Thomson, Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells, *Blood* 104 (2004) 3257 e 3266.
- [28] K.J. Svensson, H.C. Christianson, A. Witttrup, E. Bourseau-Guilmain, E. Lindqvist, L.M. Svensson, M. Morgelin, M. Belting, Exosome uptake depends on ERK1/2-Heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by Caveolin-1, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 17713 e 17724.

お問合せ先

---

バースバンク 株式会社【販売総代理店】  
〒107-0062 東京都港区南青山 3 丁目 8-40 青山センタービル 2F  
TEL : 03-5324-2580

フューチャーセルジャパン 株式会社【原料メーカー】  
〒107-0062 東京都港区南青山 3 丁目 8-40 青山センタービル 2F  
TEL : 03-5324-2294

複写や複製、コピーの譲渡、または無断で他社製品の販売ツール等に用いることは固くお断りしております。