HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	間葉系幹細胞由来エクソソームの静脈内投与はエクソソーム中のmiR-125a-3pを介して好中球細胞外トラップ形成を抑制することにより脊髄損傷を軽減する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	森島, 穣
Description	配架番号：2879
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16155号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93448
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MORISHIMA_Yutaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　森島　穣

学 位 論 文 題 名

間葉系幹細胞由来のエクソソームの静脈内投与は、エクソソームのmiR-125a-3pを介してNETs形成を調節することにより脊髄損傷を軽減する

（Intravenous administration of mesenchymal stem cell-derived exosome alleviates spinal cord injury by regulating NETs formation through exosomal miR-125a-3p）

【背景と目的】

脊髄損傷（SCI）は運動、感覚、自律神経機能に障害を引き起こし、治療法が限られている。間葉系幹細胞（MSC）の治療効果が注目され、静脈内に移植されたMSCが動物モデルで運動機能回復に効果を示すが、投与細胞は主に肺と肝臓に蓄積し、脊髄にはほとんど到達しない。これは、MSCの放出する栄養因子、サイトカイン、エクソソームが局所および全身の炎症を低減し、脊髄回復に寄与するためと考えられる。特に注目されるのが、エクソソームであり、これらはDNA、mRNA、miRNA、タンパク質などを含み、標的細胞に治療効果をもたらす。エクソソームは優れた低温保存能力と低い免疫原性を持ち、幹細胞の代替として有望視されている。しかし、好中球へのエクソソームの影響は十分に研究されていない。最近の証拠では、好中球細胞外トラップ（NETs）が局所の炎症環境を悪化させ、SCI後の神経回復を妨げることが示されている。本研究の目的は、羊膜由来MSC（AMSC）エクソソームの静脈内投与がSCIに与える影響を、特に好中球との相互作用およびNETsの形成に焦点を当てて調査することである。

【材料と方法】

カネカ社（大阪、日本）から提供されたヒト羊膜由来間葉系幹細胞（AMSC）を培養し、上清を得た後、差分遠心法を用いてエクソソームを分離した。脊髄損傷モデルについては9週齢の雌のSprague-Dawleyラットを用いた。背側椎弓切除術（T6-7）を行い、クリップで脊髄を1分間圧迫し、モデルを作成した。損傷後24時間でBBBスコアを評価し、翌日スコアが0でなかったラットは除外した。PBSで調整したAMSC由来エクソソーム（100μg）を尾静脈より3日間投与した。術後4週間にわたり、1週間ごとにBBBスコアを評価した。組織学的評価のために、脊髄損傷後28日目にラットを深麻酔し、 4%パラホルムアルデヒド（PFA）で灌流した後、脊髄を摘出した。摘出した脊髄をパラフィンに包埋して10μmの縦断面に切片化した。Kluver-Barrera染色を用いて損傷体積を評価し、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体を用いて好中球浸潤を評価した。また、免疫蛍光染色により、損傷後3日目のNETs形成を評価した。

好中球のNETs形成をin vitroでも評価した。C57BL/6マウスの末梢血から好中球を分離した。好中球をエクソソームと共培養し、ヒストンH3およびMPOを染色してNETs形成を評価した。エクソソームの好中球への取り込みは、タイムラプス蛍光イメージングを用いて評価した。また、フローサイトメトリーを用いて好中球中のNETs形成を評価した。

PET/CTを用いてエクソソームの生体内分布を評価した。64Cuで標識されたエクソソームをラットに尾静脈投与し、24時間後に臓器を摘出し、ガンマカウンターで放射能を測定した。PET/CTイメージングも実施し、エクソソームの分布を視覚化した。

【結果】
・静脈内エクソソーム投与によるマウスの脊髄損傷（SCI）の改善
エクソソームを投与された動物は、PBS を投与された動物と比べて、投与開始後 1 週間から有意に良好な神経回復を示した。Kluver-Barrera 染色により、SCI 後 4 週間で収集された脊髄組織の損傷体積がエクソソーム治療群で有意に低いことが確認された。SCI 後 4 週間の損傷周辺部位では、MPO 陽性好中球の浸潤がエクソソーム治療群で有意に減少していた。さらに、早期の好中球浸潤と NETs 形成が SCI 後 3 日目のセクションで検査され、免疫蛍光イメージングにより、CitH3 陽性細胞および MPO 陽性細胞がエクソソーム治療群で有意に減少していることが示された。
・エクソソームによる NETs 形成の in Vitro 分析
標識されたエクソソームは、共培養約 10 分後に好中球の核周囲に蓄積し始めることが観察された。次に、好中球を LPS で活性化し、エクソソームと共培養したところ、CitH3 および MPO 陽性の好中球の数は、PBS 群と比較してエクソソーム治療群で有意に減少した。さらに、フローサイトメトリー（FACS）分析により、エクソソーム投与後に CitH3 陽性 Ly6G+好中球が有意に減少していることが確認された。エクソソームが NETs 形成に及ぼす機能的メカニズムを解明するために、好中球に miR-125a-3p mimic および inhibitor でエレクトロポレーションし、LPS で活性化し、エクソソームと共培養したところ、miR-125a-3p mimic はこの NETs 抑制効果をより強化した。さらに、miR-125a-3p inhibitor の追加により NETs 抑制の効果が消失した。
・エクソソームの生体内分布
64Cu 標識エクソソームの PET イメージングにより、投与 1 時間後に肝臓および脾臓に多量に蓄積することが示された。この傾向は、投与 24 時間後の組織検出データでも確認された。興味深いことに、正常なラットに比べて SCI モデルの脊髄でエクソソームの存在が有意に高いことが示された。これにより、炎症部位でのエクソソームの蓄積の可能性が示唆された。
【考察】
静脈内に移植された AMSC 由来エクソソームは、NETs 形成を抑制することで好中球の活性化を軽減し、運動機能の回復をもたらす。この効果はエクソソームに含まれる miR-125a-3p によるものである。生体内分布解析では、エクソソームの大部分が肝臓と脾臓に蓄積し、損傷を受けた脊髄にも顕著な量が観察された。
炎症は SCI 直後に発生し、数時間以内にミクログリアが活性化され、1〜3 日の間に好中球が損傷部位に浸潤し、1 週間後にマクロファージの浸潤がピークに達する。最初に損傷部位に動員される好中球の非活性化を制御することが SCI の炎症連鎖を軽減するために重要であると考えられる。
投与タイミングと回数は重要であり、本研究では SCI 後 3 日間連続でエクソソームを投与した。この方法は、エクソソームの短い半減期を考慮し、好中球の活性化期間を十分にカバーするために必要とされる。
本研究は、NETs レベルの減少と一致して運動機能の改善を観察し、NETs と SCI による二次炎症の強い相互関係を示した。エクソソームが NETs 形成を軽減するメカニズムを理解することは、その機能を向上させるために重要であるが、これらのメカニズムは完全には理解されていない。
エクソソームの生体内分布に関する我々の調査では、エクソソームが主に肝臓と脾臓に分布し、損傷を受けた脊髄にも一定量が観察された。エクソソームの全身分布に関する知識は不完全であり、本研究のデータはこの理解に重要な貢献をする。
【結論】
AMSC 由来のエクソソームは、miR-125a-3p を介して好中球の NETs 形成を抑制することにより、脊髄損傷の軽減に重要な役割を果たす。生体内分布解析では、エクソソームの大部分が肝臓と脾臓に集中していることが示されている。