



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
Author(s)	森島, 稜
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16155
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93449
Type	doctoral thesis
File Information	MORISHIMA_Yutaka.pdf



学位論文

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)

2024 年 9 月

北海道大学

森島 穰

学位論文

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)

2024 年 9 月

北海道大学

森島 穰

目次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・	1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・	2 頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・	5 頁
諸言	・ ・ ・ ・ ・	6 頁
方法	・ ・ ・ ・ ・	7 頁
結果	・ ・ ・ ・ ・	12 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・	21 頁
結論	・ ・ ・ ・ ・	24 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	25 頁
利益相反	・ ・ ・ ・ ・	26 頁
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	27 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した

森島穰、川堀真人、山崎和義、高宮宗一郎、山口翔、中原葉、千丈創、
益田紗季子、藤岡容一郎、大場雄介、水野雄貴、久下裕司、藤村幹

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

International Journal of Molecular Sciences, 2406 • 25, (2024)

本研究の一部は以下の学会に発表した

1 森島 穰、川堀真人、山崎和義、高宮宗一郎、山口翔、中原葉、千丈創、
益田紗季子、藤岡容一郎、大場雄介、藤村幹

脊髄損傷モデルに対する間葉系幹細胞由来エクソソームの急性期静脈内投与は
好中球の活性化を抑制する

第 23 回日本分子脳神経外科学会, 2023 年 8 月, 宮崎県

2 森島 穰、川堀真人、山崎和義、高宮宗一郎、山口翔、中原葉、千丈創、
益田紗季子、藤岡容一郎、大場雄介、藤村幹

脊髄損傷モデルに対する間葉系幹細胞由来エクソソームの急性期静脈内投与は
好中球の活性化を抑制する

第 82 回日本脳神経外科総会, 2023 年 10 月, 京都市

3 森島 穰、川堀真人、山崎和義、高宮宗一郎、山口翔、中原葉、千丈創、
益田紗季子、藤岡容一郎、大場雄介、水野雄貴、久下裕司、藤村幹

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

AANS Annual Meeting 2024, 2024 年 5 月 Chicago

要旨

【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】

- ・羊膜由来間葉系幹細胞（AMSC）エクソソームの培養と分離

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。

- ・脊髄損傷モデルとエクソソーム投与

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、脊髄損傷モデルを作成した。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（100 μ g）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。

- ・組織学的解析

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 10 μ m 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。

- ・好中球と NETs 形成の *in vitro* 評価

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。

・エクソソームの生体内分布

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 形成のインビトロ分析

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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りです

AMSC amnion derived mesenchymal stem cell

LPS lipopolysaccharide

MPO myeloperoxidase

MSC mesenchymal stem cell

NETs neutrophil extracellular traps

緒言

脊髄損傷（SCI）は、脊髄が機械的損傷を受けることで発生し、運動機能、感覚機能、自律機能に様々な程度の障害を引き起こす。この状態は非常に複雑で壊滅的であり、現在の治療法は限られている。年間発生率は100万人あたり40～80人である(Bickenbach et al, 2014)。近年の研究は、間葉系幹細胞

（MSC）の治療的利用の可能性を探ることに焦点を当てている(Yamazaki et al, 2020a)。我々の研究グループを含む他の研究者たちは、損傷後間もなく静脈内移植されたMSCが動物モデルにおいて運動機能を効果的に回復させることを観察した。それにもかかわらず、移植された細胞は主に肺や肝臓に蓄積し、損傷を受けた脊髄には検出されないことが多い(Takamiya et al, 2022 ; Paul et al, 2009 ; Shin et al, 2013)。これは、幹細胞の傍受効果に起因し、細胞から放出される栄養因子、サイトカイン、エクソソームが局所および全身の炎症を抑制し、結果的に損傷した脊髄の救済に寄与するためである(Hwang et al, 2023 ; Trzeciak et al, 1986)。これらのアプローチの中で、幹細胞由来のエクソソームが注目を集めている。エクソソームは40～200 nmのナノサイズの小胞であり、二重脂質層膜に包まれ、DNA、mRNA、マイクロRNA（miRNA）、タンパク質など多様な分子を内包している(Kosaka et al, 2010)。これらの分子は標的細胞に転送され、神経疾患の緩和に治療的利益をもたらす(Valadi et al, 2007 ; Tkach et al, 2016 ; Mathieu et al, 2019)。エクソソームの卓越した凍結保存能力と低い免疫原性は、MSCに代わる有望な選択肢としてMSC由来エクソソームの使用が考えられた。以前の報告では、MSC由来エクソソームがマクロファージとミクログリアの表現型を炎症促進（M1）状態から抗炎症（M2）状態にシフトさせることによって脊髄に影響を及ぼし、アストロサイトのグリオシスを抑制し、血管新生および神経新生を促進することが示されている(Lu et al, 2023 ; Shao et al, 2023a ; Gao et al, 2023 ; Lai et al, 2022 ; Shao et al, 2023b ; He et al, 2022)。しかし、損傷後最も早く血流から脊髄に動員され、炎症の悪化を引き起こす好中球に対するエクソソームの影響はあまり研究されていない。最近の研究では、活性化好中球から放出される細胞外DNA成分で構成される好中球細胞外トラップ（NETs）が局所炎症環境を悪化させ、脊髄損傷後の神経回復を妨げることを示唆している(Shafqat et al, 2023 ; Chen et al, 2022)。NETs形成の制御は重要な治療介入の一つと考えられている。これらの状況を踏まえ、我々の研究は、脊髄損傷に対する羊膜由来MSC（AMSC）エクソソームの静脈内投与の効果を、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を目的としている。

方法

動物実験プロトコルは北海道大学大学院医学研究科の動物実験倫理委員会によって承認された（承認番号：17-0065）。すべての実験手順は、機関の動物実験ガイドラインおよび日本学術会議の動物実験の適正実施に関するガイドラインに従って行われた。

AMSC エクソソームの培養と分離

カネカ株式会社（大阪、日本）から提供されたヒト AMSC バイアルを解凍し、濃度 2.0×10^5 細胞/mL で培地に播種した。細胞は 37°C で 5 日間培養され、その後、血清不使用の細胞培養培地（MEM α 、12561056、ThermoFisher）に交換し、2 日間培養してエクソソーム含有の培地上清を得た。エクソソームの分離には、以前に記載された差動遠心法を軽微に修正して使用した (Yuyama et al, 2020 ; Yamazaki et al, 2020b)。最初に、上清を $2,000 \times g$ で 10 分間、 $10,000 \times g$ で 30 分間連続遠心して、死細胞および細胞破片を除去した。次に、上清を $100,000 \times g$ で 70 分間超遠心し、エクソソームに対応する小胞を含むペレットを得た。分離されたエクソソームのサイズと形態は、透過型電子顕微鏡（TEM、H-7100、日立、日本）およびナノ粒子トラッキング解析（Videodrop、Myriade、フランス）を用いて確認した。さらに、特定のエクソソーム表面マーカーを識別するためにウェスタンブロッティングを実施した。これには、CD 9（1:500、014-27763、富士フイルム和光、日本）、CD 63（1:500、012-27063、富士フイルム和光、日本）、およびカルネキシン（1:500、ab22595、Abcam、米国）が含まれる。

SCI モデルとエクソソームの投与

9 週齢、体重 200-233g の雌の Sprague-Dawley ラットを CLEA Japan, Inc.（日本）から取得した。ラット脊髄損傷モデルは、以前に記載された方法に従って確立した (Takamiya et al, 2022 ; Yamazaki et al, 2020 ; Yamazaki et al, 2021)。簡易的に述べると、ラットにイソフルランガス麻酔下で背側椎弓切除術（T6-7）を施行した。椎弓切除術直後に、改良動脈瘤クリップ（07-943-30、ミズホ、日本）を用いて脊髄を硬膜外で 1 分間挟み、脊髄損傷を作成した (Seki, 2008)。術後ケアとして、ラットが自力で排尿を回復するまで 1 日に 2-3 回膀胱を手動で排尿させた。脊髄損傷後 24 時間で Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアを評価し (Basso, 1995)、BBB スコアがゼロでないラットを研究

から除外した。手技を確立した後、まずパイロット実験として、1mL の PBS で調整した AMSC 5×10^5 個投与群、AMSC 由来エクソソーム $100 \mu\text{g}$ 単回投与群、AMSC 由来エクソソーム 3 日間投与群 ($100 \mu\text{g}$ 相当)、PBS 1ml 投与群に分け比較検討した (N=3)。パイロット実験の結果を確認し、本実験として、1mL の PBS で調整した AMSC 由来エクソソーム 3 日間投与群 ($100 \mu\text{g}$ 相当) または 1mL の PBS 投与群に分け、それぞれ尾静脈経由で投与した。BBB スコアは、手術後 4 週間にわたり 1 週間ごとに評価された。

組織学的解析

免疫組織化学を用いて、損傷した脊髄の体積、好中球浸潤、および脊髄での NETs 形成を、以前に報告された方法に従い、3 日目および 28 日目に評価した (Takamiya et al, 2022 ; Yamazaki et al, 2020 ; Yamazaki et al, 2021)。犠牲日に、ラットは深い麻酔をかけた後、PBS と 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で経心灌流されました。脊髄は摘出され、4%PFA で 24 時間固定後、パラフィンに包埋し、クライオスタットミクロトーム (LEICA RM2125 RTS、Leica Biosystems、ドイツ) を用いて $10 \mu\text{m}$ 厚の連続縦断切片に切断した。Kluver-Barrera 染色 (Luxol fast blue 染色不使用) を行い、SCI から 28 日後の損傷脊髄の体積を評価した。病変体積を計算するために次の式を使用した：病変体積 (mm^2) = $\pi D^2 (H_1 + H_2) / 6$ 、ここで H_1 は病変の中心から吻側端までの長さ、 H_2 は病変の中心から尾側端までの長さ、 D は病変中心の直径である (Takamiya et al, 2022 ; Yamazaki et al, 2020 ; Yamazaki et al, 2021)。28 日目の好中球浸潤は抗ミエロペルオキシダーゼ抗体 (1:1000、ab208670、Abcam、米国) を用いて評価し、Histofine Simple Stain MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス株式会社、東京、日本) を 30 分間使用し、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) (Simple Stain DAB Solution、ニチレイバイオサイエンス株式会社、日本) を 3 分間反応させた。損傷病変の周辺 (損傷中心から吻側および尾側 5mm) から画像を撮影した。非重複領域 5 箇所を選択し、陽性細胞を自動細胞カウントソフトウェア (BZ-X Analyzer、キーエンス、日本) を使用して半定量的にカウントした。NETs の評価のために、免疫蛍光染色を 3 日目の標本に対して実施した (Uozumi et al, 2020 ; Masuda, 2016 ; Kawabori, 2015)。簡易的に述べると、PFA 固定を行わずに脊髄を採取し、直ちに OCT 化合物に包埋し、新鮮凍結切片を縦断面でクライオ切片した。脊髄切片は、マウス抗ヒストン H3 (シトルリン R2+R8+R17) (1:100、Ab5103、Abcam、米国) および抗マウス/ラット MP0-FITC (1:200、LS-C140180、LSBio、米国) と 4°C で一晩インキュベートした。その後、Alexa Fluor 594 山羊抗マウス (1:500、ライフテクノロジーズ、米国) を適用した。細胞核の視覚化には DAPI または

Hoechst を含むマウント剤を使用した。MP0 陽性好中球および CitH3 陽性 NETs の数、ならびに統合 CitH3 の Hoechst 比を評価した。

好中球および NETs 形成のインビトロ評価

好中球は、10 週齢の C57BL/6 マウスの心臓穿刺により得られた全血から製造者のプロトコルに従って分離した (Neutrophil Isolation KIT、Cayman Chemical、米国)。分離された好中球の品質は、Ly6G の発現によるフローサイトメトリー (FACS) でさらに確認した (60-5931-U100、Tonbo Sciences、日本)。まずエクソソームが好中球によって取り込まれるか確認するために、エクソソームを ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit (343-09661, Dojindo, 日本) で染色し、LPS で活性化させた好中球と共培養した。インビトロ好中球での NETs 形成を評価するために、分離した好中球を 5×10^5 細胞の濃度に調整し、合計 $400 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を 4 well chamber slide で 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、 $100 \mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ の濃度のエクソソームまたは $25 \mu\text{L}$ の PBS、および $400 \mu\text{L}$ のリポ多糖 (LPS) を $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で細胞に添加し、 37°C で 3.5 時間インキュベートした (Li, 2017)。インキュベーション後、細胞を洗浄し、固定バッファ $300 \mu\text{L}$ で 15 分間固定した。0.1%NP-40 を $300 \mu\text{L}$ 添加し、細胞を透過させるために室温で 10 分間インキュベートした。NETs 形成の評価のために、免疫蛍光染色を前述の方法に従って実施した。

好中球の NET 形成を評価するために、さらにフローサイトメトリーを行った。マウス抗原に特異的な蛍光色素標識モノクローナル抗体またはビオチン化モノクローナル抗体を以下のように列挙した： PE-Ly6G (クローン 1A8、BD Pharmingen)、PerCP cy5.5-CD11b (クローン M1/70、eBioscience)、MP0-FITC、CitH3。二次試薬は Alexa Fluor 594 ヤギ抗マウス (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。好中球をエクソソーム ($100 \mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) または PBS ($25 \mu\text{L}$) と 3.5 時間共インキュベートし、その後 37°C の標準条件下で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS で 24 時間活性化した。染色した細胞懸濁液のマルチパラメトリ解析は、FACS Aria III セルソーター (BD) と FACS Diva ソフトウェア (<https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/software/instrument-software/bd-facsdiva-software>) (BD) を用いて行った。NET を発現する好中球は、CitH3+Ly6G+CD11b+ゲーティング戦略に基づいて同定され、続いてエクソソーム処理群と PBS 処理群間で比較された。

好中球の NET 形成に対するエクソソームの治療メカニズムを解明するため、エクソソーム miRNA の評価を行った。文献検索と株式会社カネカから提供された miRNA-125a-3p(miR-125a-3p)が AMSC で豊富に発現しているという信頼できるデータに基づき、候補分子として miR-125a-3p を選択した。miR-125a-3p ミミックと阻害剤 (has-miR-125a-3p, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) のエレクトロポレーションは、メーカーの推奨に従って行った。C57BL/6 マウスから単離した好中球は、Ca²⁺と Mg²⁺を含まない PBS で 2 回洗浄し、 2×10^6 個に調整した。上清を除去した後、90 μ L の R バッファー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を加え、電圧 1720V、パルス幅 10ms、miR-125a-3p 模倣体 20mM と miR-125a-3p 阻害体 100mM の合計 2 パルスでエレクトロポレーションを行った。その後、細胞を 0.5 mL を入れた 1.5 mL マイクロチューブに播種した。12 時間後、エクソソームをエクソソーム群、miR-125a-3p mimic をエレクトロポレーションした群 (mimic 群)、miR-125a-3p inhibitor をエレクトロポレーションした群 (inhibitor 群) に添加した。対照群は、エクソソームも miR も補充しなかった。その後、全群を 100 μ g/mL の LPS で刺激した。24 時間のインターバルの後、DAPI 陽性細胞集団中の CitH3 陽性細胞を定量するために、前述の免疫蛍光染色を行った。

生体内分布

静脈内投与したエクソソームの生体内分布を評価するために、動物用ポジトロン断層撮影/コンピュータ断層撮影 (PET/CT) を利用した。64Cu の同位体ブレイク法は、若干の修正を加えて、既述の方法で行った (Shi et al, 2019)。まず、エクソソームの溶液を 0.1M Na₂CO₃ 緩衝液 (pH10) に置換し、PD-SpinTrap G-25 カラム (Cytiva、東京、日本) を用いた。別途、p-SCN-Bn-NOTA (Macrocyclics, Plano, TX, USA) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解し、64CuCl₂ (138MBq, PDRadiopharma Inc. 反応中の p-SCN-Bn-NOTA 濃度は 190 μ M (106.4 mg/L) であり、このステップの放射化学収率は薄層クロマトグラフィーで測定したところ 89%であった。次に、64Cu-SCN-NOTA (12.5 μ g) を 0.1M Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10) に溶解したエクソソーム (526 μ g) と 37°C で 3 時間インキュベートした。最後に、反応混合物を PD-SpinTrap G-25 カラムで 3 回精製し、過剰の 64Cu-SCN-NOTA およびその他の低分子不純物を除去した。このゲルろ過の際、反応緩衝液を PBS に置換した。精製後の 64Cu-NOTA-エクソソームの放射化学的純度は、薄層クロマトグラフィーによる測定で 90.8%であった。減衰補正なしの放射化学的収率は全体で 8.1%であった。薄層クロマトグラフィー分析はすべて iTLC-SG プレート (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて行い、現像溶媒は 50mM EDTA (pH 5.5) であった。薄層クロマト

グラフィー上の放射能はオートラジオグラフィー (Fla-7000、富士フイルム、日本) により定量した。この薄層クロマトグラフィーシステムにおいて、 ^{64}Cu -NOTA-エクソソーム、 ^{64}Cu -SCN-NOTA、および ^{64}Cu -CuCl₂ (現像中に EDTA と錯体を形成) の Rf 値は、それぞれ 0.0、0.5-0.8、および 0.9-1.0 であった。 ^{64}Cu -NOTA-エクソソームの生体内分布を正常ラット及び脊髄損傷モデルラット (9 週齢 Sprague-Dawley) で評価した。脊髄損傷モデルラットについては、手術の翌日に実験を行った。 ^{64}Cu -NOTA エクソソーム (100kBq、27 μg) を尾静脈からラットに注射した。注射後 24 時間でラットを犠牲にし、目的の臓器を摘出して重量を測定した。これらの臓器の放射能はガンマカウンター (2480 Wizard 2 gamma counter、PerkinElmer、Waltham、MA、USA) で測定した。 ^{64}Cu -NOTA エクソソームの取り込み値は、臓器 1 グラムあたりの注入線量% (%ID/g) で表した。PET/CT イメージングは、Inveon 前臨床小動物用マルチモダリティ PET/CT システム (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) を用いて脊髄損傷モデルラット (n = 1) で実施した。 ^{64}Cu -NOTA エクソソームの PET 画像は、 ^{64}Cu -NOTA エクソソーム (8.8MBq、149 μg のエクソソーム) 投与後 60~80 分かけて取得した。PET スキャンに続いて CT 画像を取得した。画像取得中、ラットは 2.0~2.5% イソフルランで麻酔された。PET および CT データは、それぞれ Feldkamp 法および 3D-OSEM (2 反復、18MAP 反復) を用いて再構成した。PET および CT 画像は、Inveon research workplace software v. 4.1 (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) を用いて解析した。

統計解析

すべてのデータは GraphPad Prism 9 (GraphPad Software、米国) を使用して解析した。実験群間の統計的有意差は、Two-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を用いて評価した。各実験のサンプルサイズ (n) は、各図の説明に記載されている。データは平均±標準誤差 (SEM) として示し、p 値<0.05 を有意とした。

結果

・エクソソームの特性評価

TEM 画像から、エクソソームは平均直径約 80nm で一貫した形状を示すことが明らかになった (図 1A)。ナノ粒子アナライザーによるサイズ分布データでもこれが裏付けられた (図 1B)。ウェスタンブロット解析では、エクソソーム特異的マーカーである CD9 および CD63 の発現レベルが AMSC 懸濁液と比較して高いことが示された。一方で、エクソソーム中で低発現するマーカーであるカルネキシンの発現はエクソソーム中で減少していた (図 1C)。これらの結果から、AMSC 由来のサンプルにエクソソームが存在することが確認された。

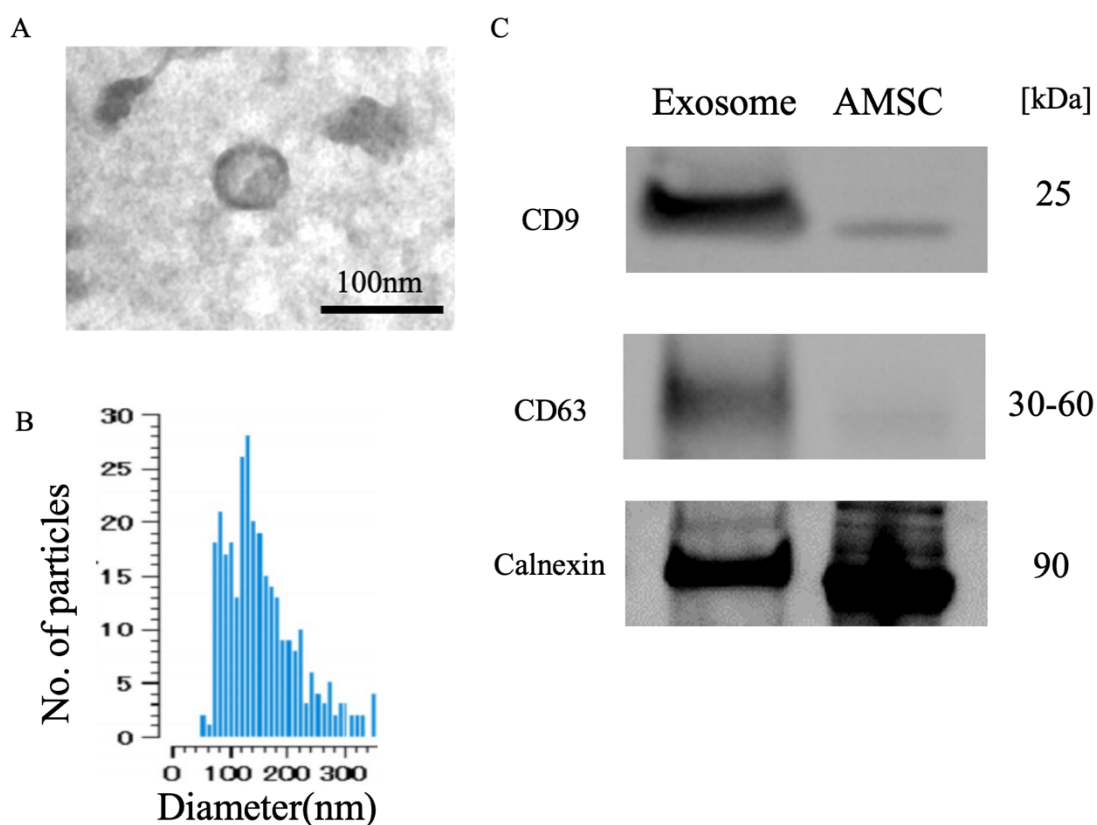


図 1 AMSC 由来エクソソーム

- (A) 電子顕微鏡写真は、約 100nm の直径を持つ円形の形態を示す小胞を示す。
(B) サイズ分布のヒストグラムは、ナノ粒子アナライザーによって得られたもので、エクソソームのサイズは 70nm から 300nm の範囲にあり、ピークは 180nm であった。
(C) ウェスタンブロット検出では、エクソソーム

が CD9 および CD63 を発現している一方で、AMSC と比較してカルネキシンの検出はほとんど認めなかった。

・ 静脈内エクソソーム投与による SCI 損傷の軽減

パイロット実験の結果、エクソソーム投与群、AMSC 投与群は PBS 投与群と比較し、神経回復が優れていることが示された。また、エクソソーム単回投与群と比較し、3 日間投与群の方が、神経回復が優れていた（図 2A）。Kluver-Barrera 染色も同様に、エクソソーム複数回投与群が最も損傷体積が小さかった（図 2B）。エクソソーム複数回投与群の方がより生理的環境に近似していると考え、本実験は複数回投与群で検討する方針とした。

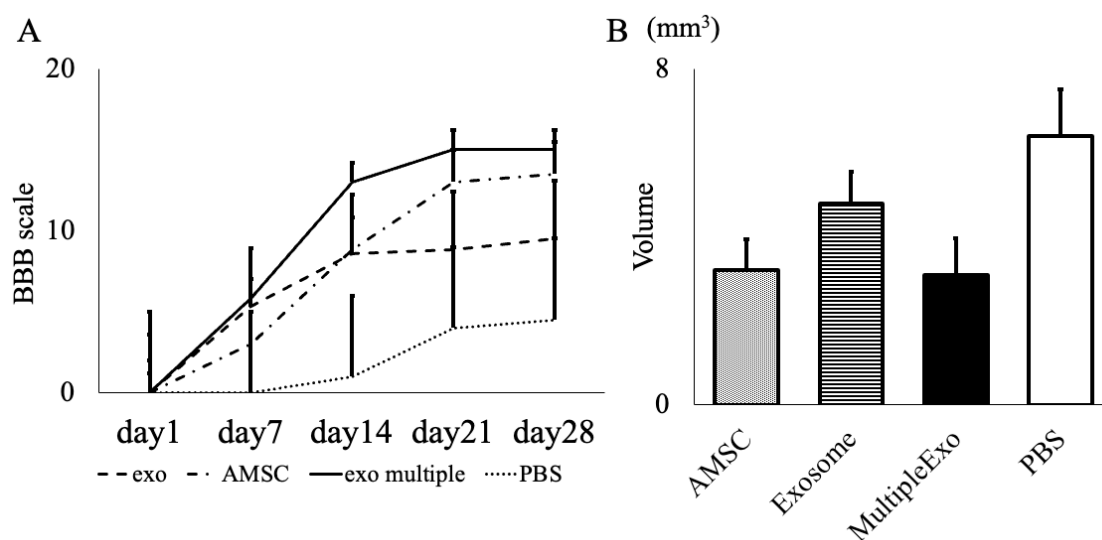


図 2 パイロット実験 (A)エクソソームおよびAMSCを投与された動物は、PBSを投与された動物と比較して、神経回復が向上した。エクソソーム複数回投与群(exo multiple)が最も神経回復効果が認められた。(B) SCI 後 4 週間の脊髄の損傷体積。

本実験でも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較して神経回復が有意に優れていることが示された (図 3A)。この回復は投与後 1 週間から始まった。Kluver-Barrera 染色により、SCI 後 4 週間で収集された脊髓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明らかになった ($p = 0.006$) (図 3B、C)。

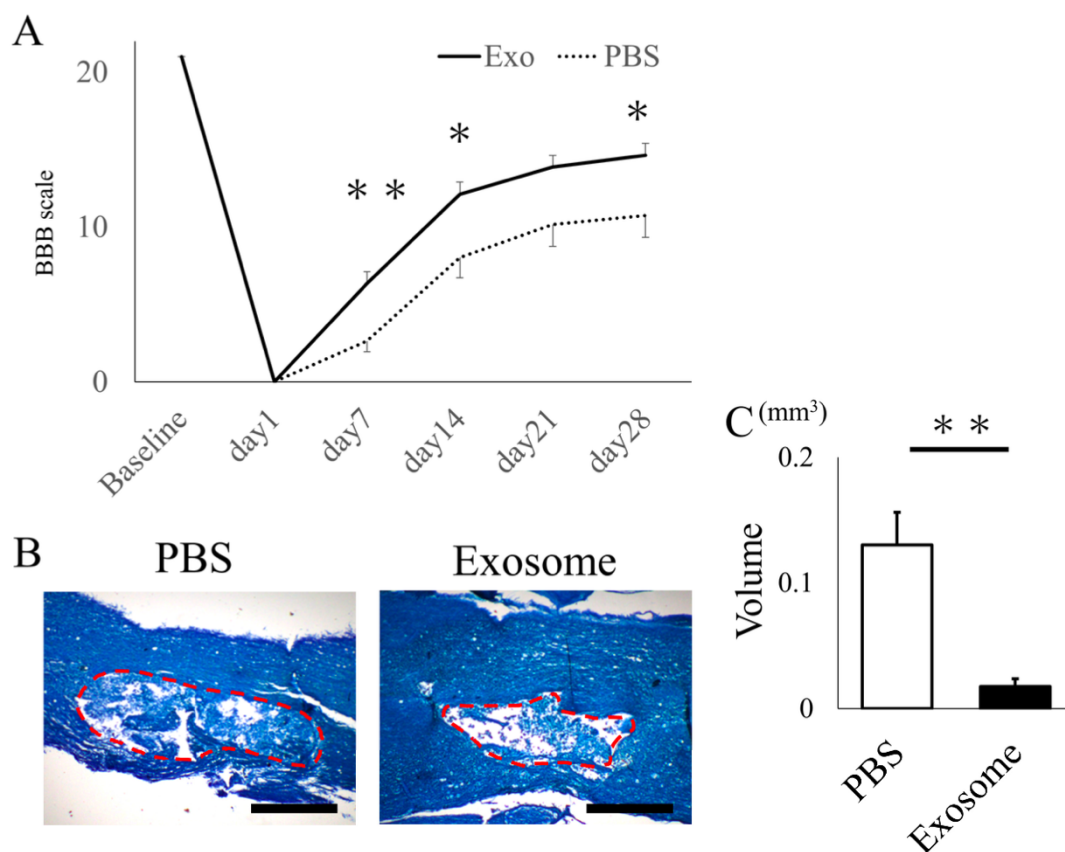


図 3 エクソソーム投与は神経機能を改善し、損傷した病変を減少させた。(A) エクソソームを投与された動物は、PBS を投与された動物と比較して、1 週間後から著しく神経回復が向上した。(B) SCI 後 4 週間の脊髓の Kluver-Barrera 染色。脊髓の損傷の程度を赤い点線の領域で示した (スケールバー = 200 μm)。 (C) エクソソーム治療群は、PBS 群と比較して損傷病変の体積が著しく縮小した ($p = 0.0061$)。 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

SCI 後 4 週間の損傷周辺領域では、エクソソーム治療群で MPO 陽性好中球の浸潤が顕著に減少していた ($p = 0.037$) (図 4A、B)。

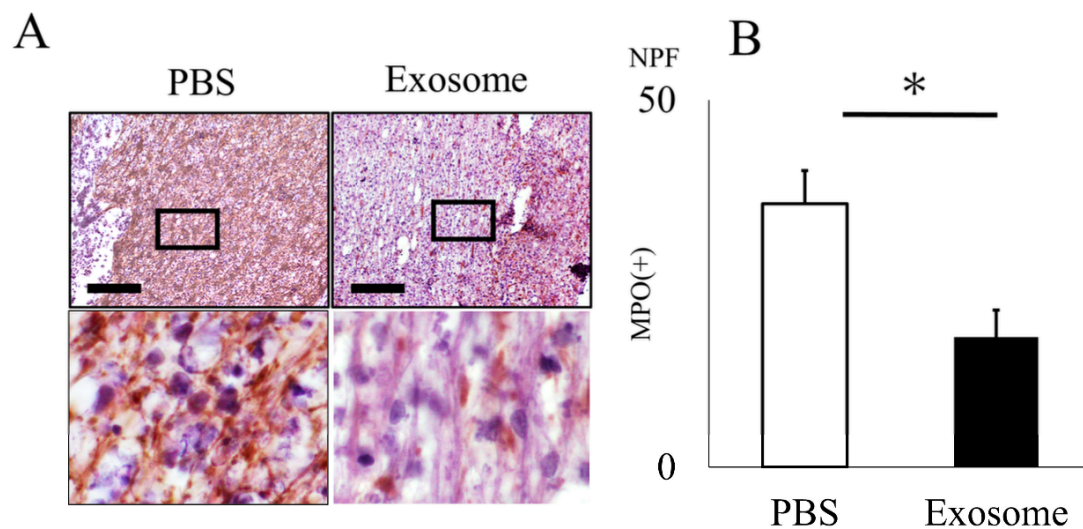


図 4 エクソソーム投与により好中球の浸潤が抑制される。(A) SCI 後 4 週間の脊髄における好中球の浸潤は、抗 MPO 抗体を用いて評価された。(B) 脊髄内の MPO 陽性細胞の数は、PBS 群と比較してエクソソーム治療群で著しく減少した (スケールバー = 20 μm , $p = 0.037$)。* $p < 0.05$ 。

さらに、早期の好中球浸潤および NETs 形成を 3 日目の切片で調べた。免疫蛍光画像では、エクソソーム治療群で CitH3 陽性細胞および MPO 陽性細胞が有意に減少していることが示された (図 5A、B) (それぞれ $p = 0.023$ 、 $p = 0.047$)。この現象は、エクソソーム治療群での核周辺ヒストンの統合による NETs の減少によってさらに確認された ($p = 0.003$ 、図 5C、D)。

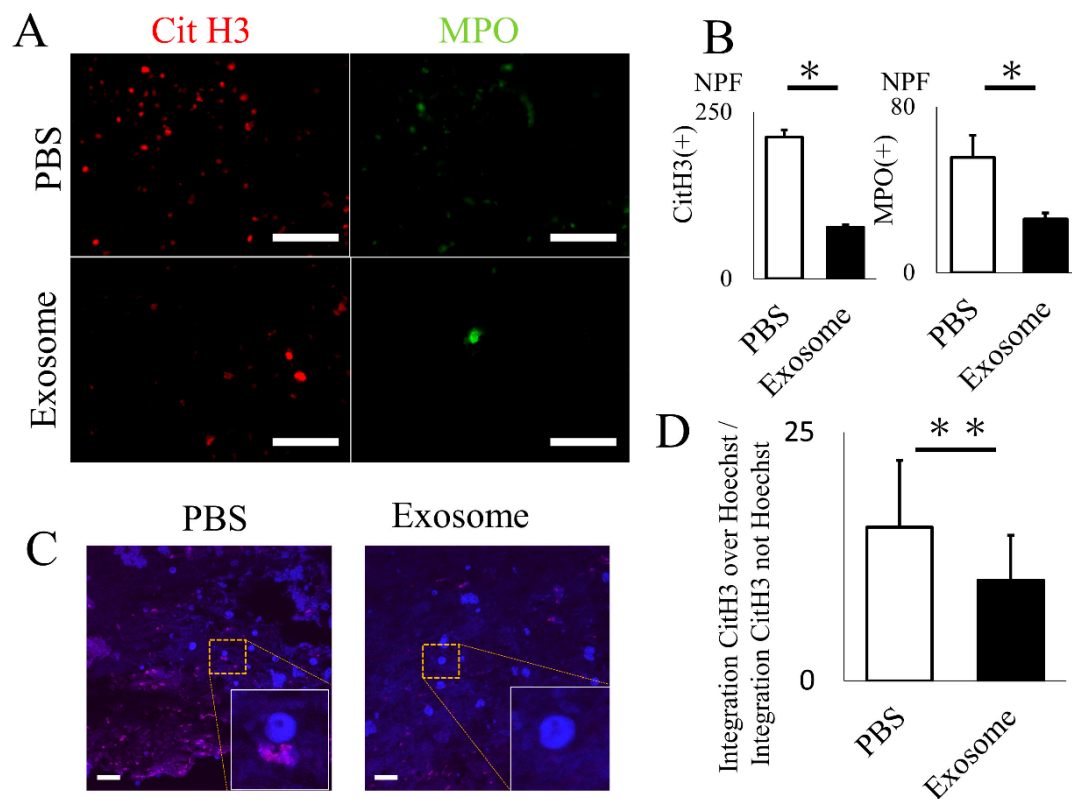


図 5 エクソソームは脊髄での NET 形成を改善した。(A、B) 免疫蛍光法により評価された NETs (CitH3) と活性化好中球 (MPO) の量は、エクソソーム治療後に脊髄で大幅に減少した (スケールバー = 50 μ m, 各々 $p = 0.0231$, $p = 0.0466$)。(C、D) NETs の存在は超解像顕微鏡でさらに評価された。PBS 群では CitH3 が核の周囲に放出されていた (スケールバー = 20 μ m, $p = 0.0027$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

- ・好中球での NETs 形成に対するエクソソームのインビトロ評価

好中球へのエクソソーム取り込みを確認するため、ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit で染色したエクソソームと好中球を共培養した。共培養 10 分後に好中球内にエクソソームが集積しており、好中球内にエクソソームが取り込まれていることが想定された。(図 6)

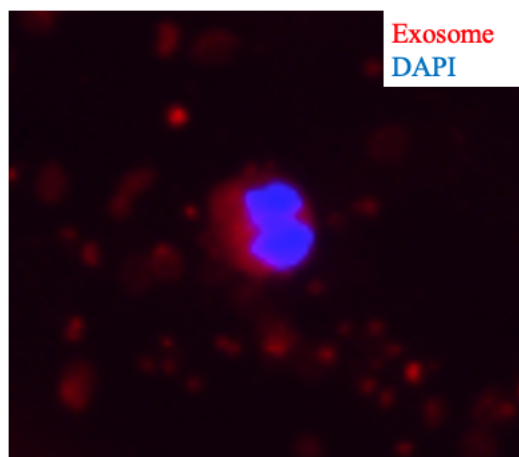


図 6 エクソソームの好中球内取り込み。好中球の核（青）周囲にエクソソーム（赤）が集積している様子が確認できた。

好中球を LPS で活性化し、エクソソームと共培養した。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（図 7A、B）。この所見はフローサイトメトリー（FACS）解析でも確認され、エクソソーム投与後の CitH3 陽性 Ly6G+好中球が有意に減少した（ $p = 0.002$ ）（図 7C、D）。

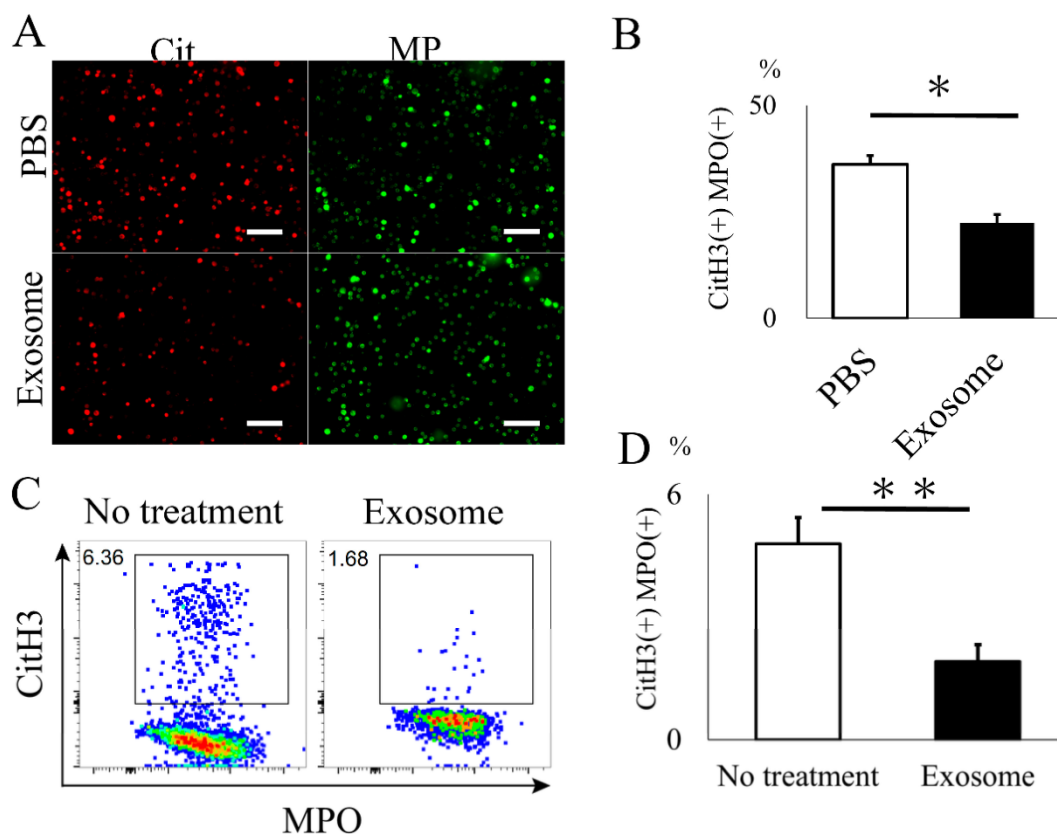


図 7 マウス好中球における NET 形成の in vitro 分析。（A、B）エクソソームで処理された好中球では、CitH3 形成が有意に減少した（スケールバー = 50 μm , $p = 0.0101$ ）。（C、D）フローサイトメトリー分析でも、エクソソーム処理群で NETs を発現する細胞の減少が示された（ $p = 0.0019$ ）。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

好中球細胞外トラップ（NETs）形成におけるエクソソームの機能メカニズムを解明するために、好中球を miR-125a-3p ミミックおよび阻害剤でエレクトロポレーションし、リポ多糖（LPS）活性化後の NETs 形成を評価した。エクソソーム投与は NETs 形成を効果的に抑制し、miR-125a-3p エレクトロポレーションはこの治療効果をわずかに増強した。さらに、miR-125a-3p 阻害剤を添加することで、エクソソーム投与の影響が完全に逆転し、エクソソーム内にカプセル化された miR-125a-3p が NETs 形成において重要な役割を果たしていることが強調された。（図 8）

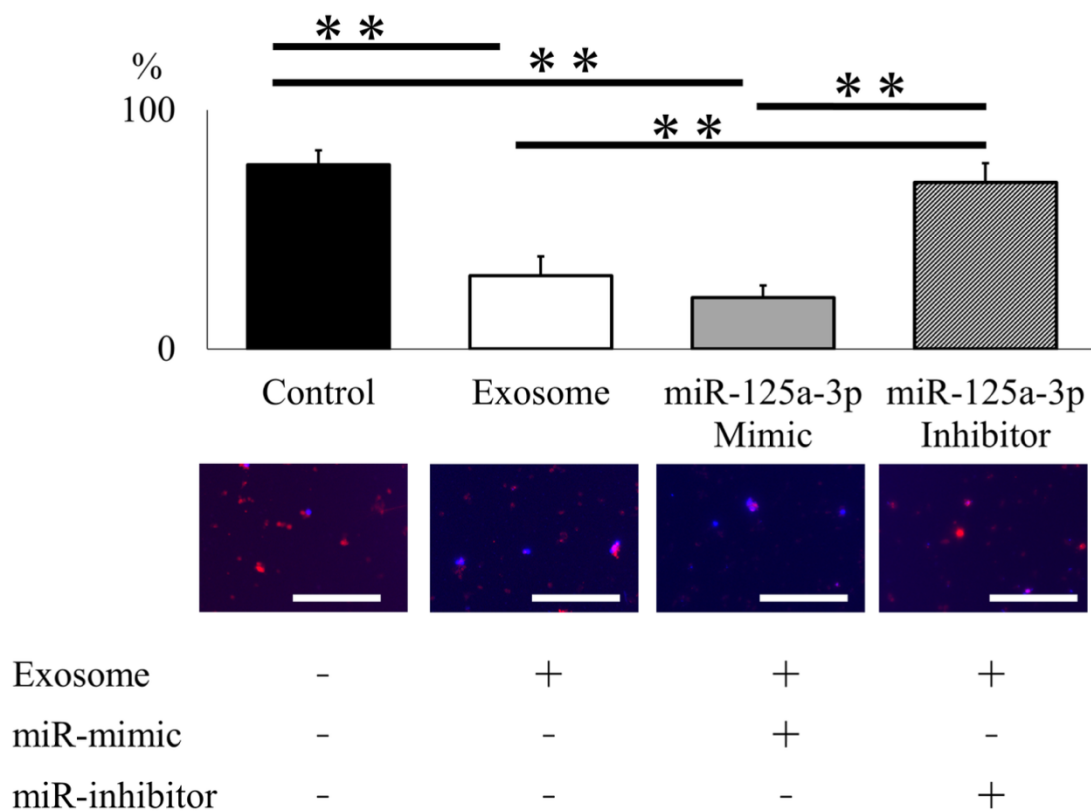


図 8 miR-125a-3p はマウス好中球の NET 形成を抑制する。エクソソーム投与により、LPS 投与後の NET 形成が抑制され、miR-125a-3p mimic は治療効果を強化した。エクソソームの効果は miR-125a-3p inhibitor によって完全に逆転した（スケールバー = 50 μ m）。** p < 0.01。

・エクソソームの生体内分布

注射 1 時間後の ^{64}Cu 標識エクソソームの PET イメージングにより、肝臓および脾臓への顕著な蓄積が明らかになった (図 9A)。注射 24 時間後の組織検出による生体内分布データでも、同様に肝臓および脾臓への蓄積傾向が示された (図 9B)。興味深いことに、エクソソームは通常のラットと比較して SCI モデルの脊髄で有意に高いことが判明した (図 9C)。この結果は、炎症部位でのエクソソーム蓄積の可能性を示唆している。

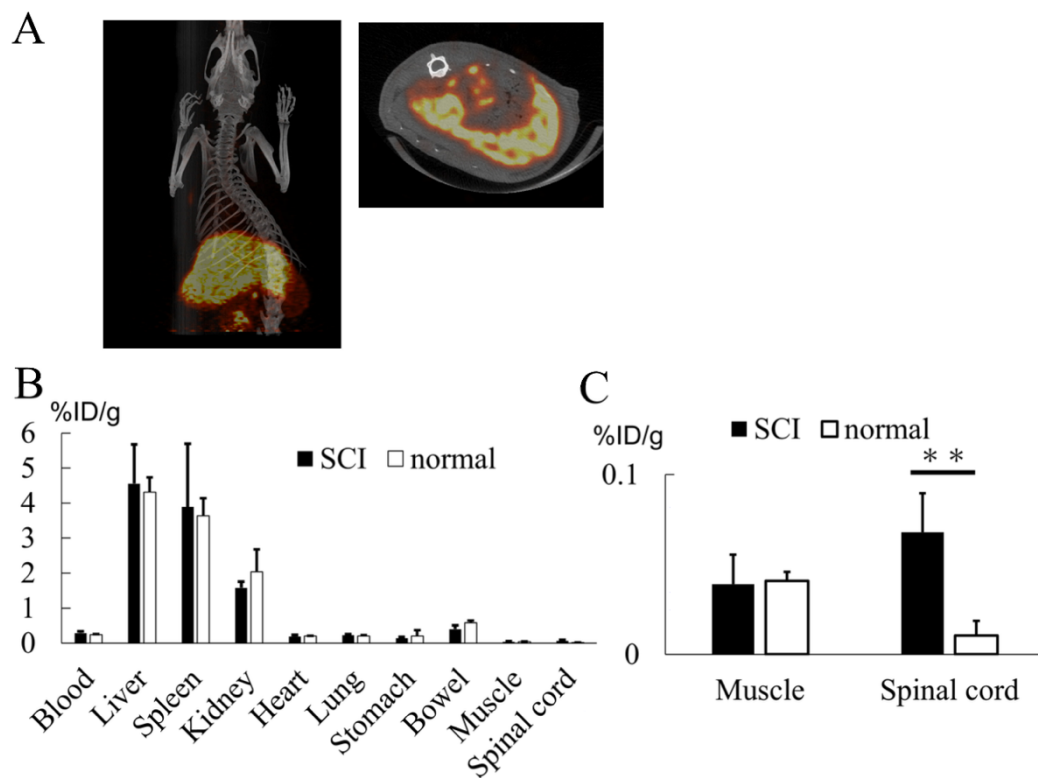


図 9 ^{64}Cu 標識エクソソームは主に肝臓と脾臓に局在した。(B) 臓器放射能活性分析により、肝臓、脾臓、および腎臓にエクソソームが大量に蓄積し、脊髄にはごく一部のみ集積していた。(C) SCI モデルでは、正常な動物と比較して脊髄でのエクソソーム蓄積が有意に増加した。このグラフの Y 軸の値が (B) のものと比較してかなり小さかった ($p = 0.0234$)。** $p < 0.01$ 。

考察

本研究では、静脈内移植された AMSC 由来のエクソソームが、NETs 形成を抑制することによって好中球の活性化を効果的に抑え、運動機能の回復をもたらすことを示した。この効果の根底にある分子メカニズムは、エクソソームに含まれる miR-125a-3p によって引き起こされることが明らかになった。PET を用いた生体内分布解析により、エクソソームの大部分が肝臓と脾臓に蓄積し、損傷した脊髄にも顕著な量が観察された。

本研究は、以前の研究に基づいており、その研究では AMSC を静脈内投与することで脊髄損傷に対して有意な機能回復が見られた。しかし、AMSC 自体は損傷した脊髄内には検出されなかった (Takamiya et al, 2022)。幹細胞治療の治療メカニズムにおいて、幹細胞から放出されるエクソソームが重要な役割を果たしていると考えられており、脊髄損傷において多くの実験が進行中である (Zhang et al, 2019 ; Liu et al, 2021 ; Herbert et al, 2022)。これらのメカニズムは、損傷の軽減と神経・血管新生の促進という 2 つのパターンに分類される。エクソソームの早期投与を取り入れた研究の多くは、抗アポトーシス、血脊髄関門の保持、および免疫調節を含む損傷の軽減に焦点を当てている。免疫調節はしばしばマクロファージの非活性化を伴うが、好中球の非活性化におけるエクソソームの治療的役割はほとんど探求されていない (Hu et al, 2013)。この研究の少なさの根本的な理由は、好中球の ex-vivo 培養がミクログリアやマクロファージと比べて難しいためかもしれない。炎症は脊髄損傷直後に現れ、最初の数時間でミクログリアが活性化され、その後 1~3 日以内に損傷した脊髄に好中球が浸潤し、最初の損傷から約 1 週間でマクロファージのピーク浸潤に至る。損傷した脊髄に最初に誘導される非居住細胞として、好中球の非活性化を制御することが、SCI における炎症のカスケードを軽減するために極めて重要であると考えられる (Fleming et al, 2006 ; Hellenbrand et al, 2021 ; Stirling and Yong, 2008)。

投与のタイミングに加えて、投与回数も重要である。本報告では、SCI 後 3 日間連続でエクソソームを投与したが、これは MSC からのエクソソーム分泌の自然なパターンを模倣している (Matsushita et al, 2015)。これは、3 日間に分割してエクソソームを投与することで、同じ期間に全量を一度に投与するよりも優れた機能改善が見られた中崎らの研究と一致している (Nakazaki et al, 2021)。エクソソームの非常に短い半減期が報告されているため (Riau et al,

2019)、好中球の活性化期間を適切にカバーするためには複数回の投与が必要と考えられる。

SCI モデルにおける NETs 形成の機能的役割に関するデータは限られているが、蓄積された証拠は、NETs 形成が直接的な神経損傷、ミクログリアの活性化、および反応性神経膠症の誘導などのさまざまな経路を通じて中枢神経系疾患を悪化させるという概念を支持している (Shafqat et al, 2023 ; Chen et al, 2022)。Feng らは以前、NETs 形成が炎症を促進し、血液脳関門 (BBB) を破壊することにより、SCI 後の二次損傷を悪化させることを報告し、DNase を用いた NETs の分解が脊髄損傷後の運動機能の向上につながることを示した (Feng et al, 2021)。これらの発見と一致して、我々の現在の研究でも、NETs レベルの低下に伴う運動機能の改善が観察され、NETs と脊髄損傷に起因する二次的炎症との強い相互関係が強調された。

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。タイムラプスイメージングは、エクソソームが好中球の核周囲に集まることを示しており、好中球に活性分子を届ける可能性を示唆している。本研究では、炎症に関与し、AMSC で豊富に発現していることがよく知られている miR-125a-3p をエクソソームの治療分子として選択した。その結果、miR-125a-3p 阻害剤はエクソソームの NETs 抑制効果を打ち消し、その抗炎症プロセスにおける役割を確認した。これらの発見は、miR-125a-3p がトール様受容体 4 (TLR4) を介した NF- κ B シグナル伝達経路を標的とすることで NETs を抑制することを報告した Jin らの研究と一致している (Jin et al, 2023)。さらに、TLR4/JNK シグナルも好中球による NETs 形成に関与していることが報告されている (Wang et al, 2023)。それにもかかわらず、miR-125a-3p は、インターフェロン調節因子 5 (IRF5) を介してミクログリアの表現型を変化させることにも関与している。MSC 由来エクソソームにおける miR-125a-3p のノックダウンは、脊髄組織における IRF5 の発現を増加させた (Chang et al, 2021)。miR-125a-3p は複数のメカニズムを介して作用している可能性があり、その抗炎症メカニズムを包括的に解明するためにはさらなる評価が必要である。さらに、MSC 由来エクソソームは C5b-9 アセンブリの抑制を通じて NETs 形成を軽減することが報告されている (Loh et al, 2022)。miR-125a-3p を含まない他の経路もこのプロセスに寄与している可能性がある。

さらに、本研究ではエクソソームが主に肝臓と脾臓に分布し、損傷した脊髄にも顕著な量が観察されることが明らかになった。以前の報告では、脾臓と損傷

した脊髄にエクソソームが存在することが記録されているが、体全体での分布に関する包括的な知識はまだ不完全である (Lankford et al, 2018 ; Guo et al, 2019)。本研究で提示されたデータは、この理解に大きく貢献している。循環するラットの血液から得られた好中球は、NETs 形成が低いことが観察され、これは好中球が蓄積される脾臓でのエクソソームの蓄積と一致している。以前の報告によると、損傷した脊髄に蓄積されたエクソソームは、ミクログリアを直接非活性化する効果があり、最終的に機能回復につながることを示されている (Guo et al, 2019)。局所および全身の炎症が重要な役割を果たす急性期に、損傷した脊髄にエクソソームが存在することは、さらなる調査が必要である。

我々の研究にはいくつかの制限がある。まず、エクソソームの内容物を包括的に分析して、潜在的な治療候補を特定することができなかった。これには、タンパク質、mRNA、miRNA、その他の未知の分子を含むさまざまな要素が機能回復に寄与している可能性があり、これらの異なる分子の役割を一度に調査するのは非常に困難である。次に、エクソソームが好中球に対して作用する正確な臓器を検出することができなかった。我々はそれが脾臓であると仮定しているが、循環する好中球も一つの選択肢である。第三に、好中球の炎症パラメーター（局所のサイトカイン発現など）を調査しなかった。エクソソーム群で後期（28 日）に好中球の蓄積が少なく、SCI 損傷が減少したことは、炎症性サイトカインの発現が低いことを示唆している。

結論

- AMSC 由来のエクソソームは脊髄損傷後の運動機能を回復させた
- AMSC 由来のエクソソーム投与により脊髄への好中球の浸潤が抑制され、好中球の NETs 形成を抑制した
- AMSC 由来のエクソソームは in Vitro でも NETs 抑制効果を認めた
- miR-125a-3p がエクソソームの NETs 抑制効果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た
- これらの発見により間葉系幹細胞由来のエクソソームの役割として、新しい知見を得るとともに、脊髄損傷後の治療メカニズムへの理解を一步進めることができた
- 一方でエクソソーム内の含有物質について、包括的な解明にはいたっておらず、さらなる研究が必要である

謝辞

本研究の一部は，日本学術振興会基盤研究(C)23K08557 の助成を受けたものである。

ヒト羊膜由来間葉系幹細胞バイアルを株式会社カネカから提供された

利益相反

共著者：山口 翔は株式会社カネカ 再生・細胞医療研究所に所属しています。

なお、評価項目は盲目化しています。

引用文献

- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12:1-21.
- Bickenbach J, Officer A, Shakespeare T, von Groote P (2014) *International Perspectives on Spinal Cord Injury*. 1st edn: World Health Organization.
- Chang Q, Hao Y, Wang Y, Zhou Y, Zhuo H, Zhao G (2021) Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-125a promotes M2 macrophage polarization in spinal cord injury by downregulating IRF5. *Brain Res Bull*, 170:199-210.
- Chen Y, Zhang H, Hu X, Cai W, Ni W, Zhou K (2022) Role of NETosis in Central Nervous System Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2022:3235524.
- Feng Z, Min L, Liang L, Chen B, Chen H, Zhou Y, Deng W, Liu H, Hou J (2021) Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Secondary Injury via Promoting Neuroinflammation and Blood-Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury. *Front Immunol*, 12:698249.
- Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, 129:3249-3269.
- Fujioka Y, Kashiwagi S, Yoshida A, Satoh AO, Fujioka M, Amano M, Yamauchi Y, Ohba Y (2022) A method for the generation of pseudovirus particles bearing SARS coronavirus spike protein in high yields. *Cell Struct Funct*, 47:43-53.
- Gao X, Gao LF, Zhang YN, Kong XQ, Jia S, Meng CY (2023) Huc-MSCs-derived exosomes attenuate neuropathic pain by inhibiting activation of the TLR2/MyD88/NF-kappaB signaling pathway in the spinal microglia by targeting Rsad2. *Int Immunopharmacol*, 114:109505.
- Guo S, Perets N, Betzer O, Ben-Shaul S, Sheinin A, Michaelievski I, Popovtzer R, Offen D, Levenberg S (2019) Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury. *ACS Nano*, 13:10015-10028.
- He X, Yang L, Dong K, Zhang F, Liu Y, Ma B, Chen Y, Hai J, Zhu R, Cheng L (2022) Biocompatible exosome-modified fibrin gel accelerates the recovery of spinal cord injury by VGF-mediated oligodendrogenesis. *J Nanobiotechnology*, 20:360.
- Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, Morehouse CN, Fixel JA, Hanna AS (2021) Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J Neuroinflammation*, 18:284.

Herbert FJ, Bharathi D, Suresh S, David E, Kumar S (2022) Regenerative Potential of Stem Cell-derived Extracellular Vesicles in Spinal Cord Injury (SCI). *Curr Stem Cell Res Ther*, 17:280-293.

Hu JZ, Huang JH, Zeng L, Wang G, Cao M, Lu HB (2013) Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 30:1349-1360.

Hwang J, Jang S, Kim C, Lee S, Jeong HS (2023) Role of Stem Cell-Derived Exosomes and microRNAs in Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*, 24.

Jin Z, Huang Q, Peng J, Liu Z, Hu R, Wu J, Wang F (2023) MiR-125a-3p alleviates hyperproliferation of keratinocytes and psoriasis-like inflammation by targeting TLR4/NF-kappaB pathway. *Postepy Dermatol Alergol*, 40:447-461.

Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, Nakamura MC, Yenari MA (2015) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci*, 35:3384-3396.

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T (2010): Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101:2087-2092.

Lai X, Wang Y, Wang X, Liu B, Rong L (2022) miR-146a-5p-modified hUCMSC-derived exosomes facilitate spinal cord function recovery by targeting neurotoxic astrocytes. *Stem Cell Res Ther*, 13:487.

Lankford KL, Arroyo EJ, Nazimek K, Bryniarski K, Askenase PW, Kocsis JD (2018) Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord. *PLoS One*, 13:e0190358.

Loh JT, Zhang B, Teo JKH, Lai RC, Choo ABH, Lam KP, Lim SK (2022) Mechanism for the attenuation of neutrophil and complement hyperactivity by MSC exosomes. *Cytotherapy*, 24:711-719.

Li RHL, Ng G, Tablin F (2017) Lipopolysaccharide-induced neutrophil extracellular trap formation in canine neutrophils is dependent on histone H3 citrullination by peptidylarginine deiminase. *Vet Immunol Immunopathol*, 193-194:29-37.

Liu WZ, Ma ZJ, Li JR, Kang XW (2021) Mesenchymal stem cell-derived exosomes: therapeutic opportunities and challenges for spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther*, 12:102.

Lu X, Xu G, Lin Z, Zou F, Liu S, Zhang Y, Fu W, Jiang J, Ma X, Song J (2023) Engineered exosomes enriched in netrin-1 modRNA promote axonal growth in spinal cord injury by attenuating inflammation and pyroptosis. *Biomater Res*, 27:3.

Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A (2016) NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*, 459:89-93.

Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Thery C (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*, 21:9-17.

Matsushita T, Lankford KL, Arroyo EJ, Sasaki M, Neyazi M, Radtke C, Kocsis JD (2015) Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*, 267:152-164.

Nakazaki M, Morita T, Lankford KL, Askenase PW, Kocsis JD (2021) Small extracellular vesicles released by infused mesenchymal stromal cells target M2 macrophages and promote TGF-beta upregulation, microvascular stabilization and functional recovery in a rodent model of severe spinal cord injury. *J Extracell Vesicles*, 10:e12137.

Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B (2009) Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*, 34:328-334.

Riau AK, Ong HS, Yam GHF, Mehta JS (2019) Sustained Delivery System for Stem Cell-Derived Exosomes. *Front Pharmacol*, 10:1368.

Satoh AO, Fujioka Y, Kashiwagi S, Yoshida A, Fujioka M, Sasajima H, Nanbo A, Amano M, Ohba Y (2023) Interaction between PI3K and the VDAC2 channel tethers Ras-PI3K-positive endosomes to mitochondria and promotes endosome maturation. *Cell Rep*, 42:112229.

Seki T, Fehlings MG (2008) Mechanistic insights into posttraumatic syringomyelia based on a novel in vivo animal model. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*, 8:365-375.

Senjo H, Harada S, Kubota SI, Tanaka Y, Tateno T, Zhang Z, Okada S, Chen X, Kikuchi R, Miyashita N, et al (2023) Calcineurin inhibitor inhibits tolerance induction by suppressing terminal exhaustion of donor T cells after allo-HCT. *Blood*, 142:477-492.

Shafqat A, Noor Eddin A, Adi G, Al-Rimawi M, Abdul Rab S, Abu-Shaar M, Adi K, Alkattan K, Yaqinuddin A (2023) Neutrophil extracellular traps in central nervous system pathologies: A mini review. *Front Med (Lausanne)*, 10:1083242.

Shao Y, Wang Q, Liu L, Wang J, Wu M (2023a) Alleviation of Spinal Cord Injury by MicroRNA 137-Overexpressing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Tohoku J Exp Med*, 259:237-246.

Shao Y, Wang Q, Liu L, Wang J, Wu M (2023b) Exosomes from microRNA 146a overexpressed bone marrow mesenchymal stem cells protect against spinal cord injury in rats. *J Orthop Sci*, 28:1149-1156.

Shi S, Li T, Wen X, Wu SY, Xiong C, Zhao J, Lincha VR, Chow DS, Liu Y, Sood AK, Li C (2019) Copper-64 Labeled PEGylated Exosomes for In Vivo Positron Emission Tomography and Enhanced Tumor Retention. *Bioconjug Chem*, 30:2675-2683.

Shimomura T, Seino R, Umezaki K, Shimoda A, Ezoe T, Ishiyama M, Akiyoshi K (2021) New Lipophilic Fluorescent Dyes for Labeling Extracellular Vesicles: Characterization and Monitoring of Cellular Uptake. *Bioconjug Chem*, 32:680-684.

Shin DA, Kim JM, Kim HI, Yi S, Ha Y, Yoon DH, Kim KN (2013) Comparison of functional and histological outcomes after intralaminar, intracisternal, and intravenous transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 155:1943-1950.

Stirling DP, Yong VW (2008) Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry. *J Neurosci Res*, 86:1944-1958.

Takamiya S, Kawabori M, Yamazaki K, Yamaguchi S, Tanimori A, Yamamoto K, Ohnishi S, Seki T, Konno K, Tha KK, et al (2022) Intravenous transplantation of amnion-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery and alleviates intestinal dysfunction after spinal cord injury. *PLoS One*, 17:e0270606.

Tkach M, Thery C (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164:1226-1232.

Trzeciak HI, Janas P, Herman ZS (1986) Effects of chronic oral administration of imipramine in the rat forced swimming test. *Pol J Pharmacol Pharm*, 38:179-183.

Uozumi R, Iguchi R, Masuda S, Nishibata Y, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A (2020) Pharmaceutical immunoglobulins reduce neutrophil extracellular trap formation and ameliorate the development of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Mod Rheumatol*, 30:544-550.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9:654-659.

Wang Z, Zhu D, Zhang Y, Xia F, Zhu J, Dai J, Zhuge X (2023) Extracellular vesicles produced by avian pathogenic Escherichia coli (APEC) activate macrophage proinflammatory response and neutrophil extracellular trap (NET) formation through TLR4 signaling. *Microb Cell Fact*, 22:177.

Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Houkin K (2020a) Clinical Trials of Stem Cell Treatment for Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*, 21.

- Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Takamiya S, Tateno T, Konno K, Watanabe M, Houkin K (2020b) FTY720 Attenuates Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury by Decreasing Systemic and Local Inflammation in a Rat Spinal Cord Compression Model. *J Neurotrauma*, 37:1720-1728.
- Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Takamiya S, Konno K, Watanabe M, Houkin K, Fujimura M (2021) Mesenchymal Stem Cell Sheet Promotes Functional Recovery and Palliates Neuropathic Pain in a Subacute Spinal Cord Injury Model. *Stem Cells Int*, 9964877.
- Yuyama K, Takahashi K, Usuki S, Mikami D, Sun H, Hanamatsu H, Furukawa J, Mukai K, Igarashi Y (2019) Plant sphingolipids promote extracellular vesicle release and alleviate amyloid-beta pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 9:16827.
- Yuyama K, Sun H, Mikami D, Mioka T, Mukai K, Igarashi Y (2020) Lysosomal-associated transmembrane protein 4B regulates ceramide-induced exosome release. *FASEB J*, 34:16022-16033.
- Zhang ZG, Buller B, Chopp M (2019) Exosomes - beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury. *Nat Rev Neurol*, 15:193-203.