



Title	低酸素虚血性脳障害に対する間葉系幹細胞由来エクソソーム経鼻投与の治療効果に関する研究
Author(s)	池田, 拓磨
Description	配架番号 : 2946
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16636号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16636
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98246
Type	doctoral thesis
File Information	IKEDA_Takuma.pdf, 全文



学 位 論 文

低酸素虚血性脳障害に対する間葉系幹細胞由来
エクソソーム経鼻投与の治療効果に関する研究

(Studies on therapeutic efficacy of intranasal administration of
mesenchymal stem cell-derived exosome for hypoxic-ischemic
brain injury)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

池 田 拓 磨

学 位 論 文

低酸素虚血性脳障害に対する間葉系幹細胞由来
エクソソーム経鼻投与の治療効果に関する研究

(Studies on therapeutic efficacy of intranasal administration of
mesenchymal stem cell-derived exosome for hypoxic-ischemic
brain injury)

2025 年 9 月

北 海 道 大 学

池 田 拓 磨

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
緒言	6 頁
方法	8 頁
結果	12 頁
考察	22 頁
結論	25 頁
利益相反	27 頁
引用文献	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Takuma Ikeda, Masahito Kawabori, Yuyuan Zheng, Sho Yamaguchi, Shuho Gotoh, Yo Nakahara, Erika Yoshie and Miki Fujimura
Intranasal administration of mesenchymal stem cell-derived exosome alleviates hypoxic-ischemic brain injury
Pharmaceutics 2024, 16(4),446

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 池田拓磨, 川堀真人, 鄭煜源, 山口翔, 後藤秀輔, 中原葉, 吉江恵梨香, 藤村幹
間葉系幹細胞エクソソーム経鼻投与による低酸素虚血性脳障害に対する治療効果
第 28 回神経麻酔集中治療学会, 2024 年 7 月 13-14 日, 倉敷
2. 池田拓磨, 川堀真人, 鄭煜源, 山口翔, 後藤秀輔, 中原葉, 吉江恵梨香, 藤村幹
間葉系幹細胞エクソソーム経鼻投与による低酸素虚血性脳障害に対する治療効果
第 24 回分子脳神経外科学会, 2024 年 7 月 19-20 日, 佐賀
3. 池田拓磨, 川堀真人, 鄭煜源, 山口翔, 後藤秀輔, 中原葉, 吉江恵梨香, 藤村幹
間葉系幹細胞エクソソーム経鼻投与による低酸素虚血性脳障害に対する治療効果
第 83 回日本脳神経外科学会学術総会, 2024 年 10 月 16-18 日, 横浜
4. 池田拓磨, 川堀真人, 鄭煜源, 山口翔, 後藤秀輔, 中原葉, 吉江恵梨香, 藤村幹
間葉系幹細胞エクソソーム経鼻投与による低酸素虚血性脳障害に対する治療効果
第 11 回日本細胞外小胞学会学術集会, 2024 年 10 月 28-29 日, 新宿
5. 池田拓磨, 川堀真人, 鄭煜源, 山口翔, 後藤秀輔, 中原葉, 吉江恵梨香, 藤村幹
間葉系幹細胞エクソソーム経鼻投与による低酸素虚血性脳障害に対する治療効果
第 24 回日本再生医療学会総会, 2025 年 3 月 20-22 日, 横浜

要旨

【背景と目的】低酸素虚血性脳障害は、心停止、窒息、溺水などによる全脳虚血後に生じる病態である。特に心肺停止後における低酸素虚血性脳障害では、海馬などの選択的脆弱領域において神経細胞死が生じ重篤な高次脳機能障害を引き起こすため、神経学的な予後は不良である。現在、介入方法は限られており新たな治療法の開発が急務となっている病態である。幹細胞療法は、さまざまな機序による神経保護作用により中枢神経疾患への応用が検討されており、その作用メカニズムとしてエクソソームが注目されている。エクソソームは生体内において細胞間の情報伝達物質として生理的に存在する構造体であり、脂質二重膜の内部にマイクロRNA、メッセンジャーRNA、DNA、タンパク質、脂質など多様な生理活性物質を内包し、標的細胞に到達して作用を発揮する。間葉系幹細胞由来エクソソームの疾患治療への応用が進められており、中枢神経疾患に対する治療効果も報告されている。投与方法として、従来の静脈投与に替わって経鼻投与が中枢神経系への有望な送達経路として注目されている。本研究では間葉系幹細胞由来エクソソームを経鼻投与し、低酸素虚血性脳障害に対する治療効果を検討した。

【材料と方法】ヒト羊膜由来間葉系幹細胞を培養し、その培養上清から超遠心法によりエクソソームを回収した。透過型電子顕微鏡、微粒子解析装置、およびWestern blotによりエクソソームの特性の確認および測定を行った。動物モデルとしてSprague-Dawleyラットを用い、外科的に4血管閉塞モデルを作製し低酸素虚血性脳障害を誘導した。治療群には 3×10^8 個のエクソソームを、対照群には20 μ LのPBSをそれぞれ低酸素虚血性脳障害後7日間連日で経鼻的に投与した。神経行動機能の評価には8方向放射状迷路を用い、短期および長期的な空間記憶を評価した。また、エクソソームの脳内分布を確認するため、蛍光標識したエクソソームを経鼻投与し、投与後1時間・3時間・24時間の時点で標本を作成して観察・測定を行った。神経細胞障害に対する組織学的評価として、TUNEL染色、Fluoro-Jade C染色およびニッスル染色を実施した。さらに、神経障害の背景に存在する炎症の評価のためマイクログリアのマーカーであるIba1、および炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6、TNF- α に対する免疫蛍光染色を行った。加えて、エクソソームがマイクログリアに作用して炎症を抑制する機序の裏付けとして、マウスマイクログリアBV2細胞を用いたin vitro実験を行った。

【結果】抽出されたエクソソームは、電子顕微鏡観察において直径約 100 nm の球状構造を示し、粒径分布では約 110 nm に最頻値を有する集団であり、エクソソーム特異的マーカーである CD63 および CD9 の発現が確認された。8 方向放射状迷路を用いた神経行動機能評価では、エクソソームを経鼻投与されたラットでは低酸素虚血性脳障害後 10 日目から 14 日目にかけて短期記憶の著明な改善が認められ、さらに 28 日目の評価における長期記憶の有意な改善が観察された。蛍光標識したエクソソームを経鼻投与したラットでは、投与後 1 時間で嗅神経において蛍光シグナルの強い分布が確認され、3 時間および 24 時間後には、脳その他部位における蛍光の集積が増加していた。免疫組織化学染色の結果、虚血に対して脆弱な海馬 CA1 領域では、エクソソーム投与群において神経細胞のアポトーシス、壊死、変性の所見が対照群と比較して有意に少なく、神経細胞の生存率が向上していた。また、同領域ではマイクログリアの活性化が抑制され、炎症性サイトカインの発現も低下していた。マウス BV2 マイクログリア細胞を用いた *in vitro* 実験においては、リポポリサッカライド刺激によって誘導される IL-6 および TNF- α の分泌がエクソソーム添加によって有意に抑制された。

【考察】本研究において、間葉系幹細胞由来エクソソームは低酸素虚血性脳障害を負ったラットの海馬領域において、マイクログリア由来の炎症を緩和し、神経細胞のアポトーシス・壊死・変性などの神経障害を軽減することにより、神経行動機能の改善をもたらした。今回評価した短期・長期記憶を含む高次脳機能障害は、低酸素虚血性障害後の患者において最も重篤な後遺症の一つであり、主たる原因の一つが海馬 CA1 領域の損傷と考えられている。本研究では、エクソソーム投与により海馬 CA1 領域の神経細胞生存率が向上し、それに伴って短期・長期記憶機能の改善が認められた。これらの所見は、これまでに報告されている知見と一致するものである。間葉系幹細胞由来エクソソームの神経保護作用については、抗アポトーシス作用、アストロサイトやマイクログリアの不活性化、血液脳関門の保護、神経再生促進、シナプス形成促進など、複数のメカニズムが報告されている。本研究では特に、マイクログリア活性の調節を介した抗炎症作用および抗アポトーシス作用が神経保護効果の一因であることが示唆された。さらに本研究では、間葉系幹細胞由来エクソソームを経鼻投与したところ、投与 1 時間後には嗅神経への集積が確認され、その後 24 時間まで脳内での蓄積が増加することが示された。これまで、エクソソームの中枢神経への送達法としては、静脈内投与や脳内・髄腔内投与が主に用いられてきたが、静脈内投与では脳内到達率

が極めて低く（0.00～0.01 %）、大部分が肝臓や肺などの臓器に蓄積してしまうため、効率性に課題がある。また、脳内や髄腔内への直接投与は侵襲性が高く臨床応用には制限がある。一方、経鼻投与は非侵襲的かつ中枢神経系への送達効率が高い投与方法として注目されている。エクソソームは非常に小型の粒子であるため、鼻腔に投与されると嗅神経あるいは三叉神経を經由して脳内へ移行することができるとされており、本研究の結果もこれらの機序と一致するものであった。実際、動物モデルにおいては種々の中枢神経疾患へのエクソソーム経鼻投与の有効性が報告されており、海外ではすでに臨床試験が進行している事例もある。なお、本実験では蛍光標識キットを用いてエクソソームの脳内分布を観察した。この方法は簡便である一方、脳内に移行したエクソソームの粒子数など定量的な評価が困難である点は、本研究の限界の一つと考えられる。また、マイクログリアの抑制や炎症制御による神経保護作用が示唆されたが、実際に効果を発揮していたエクソソーム内の生理活性物質の同定には至っておらず、今後はマイクロアレイ解析やリアルタイム PCR を用いた詳細な検討が必要である。さらに、本研究では障害後 28 日間における神経行動機能の改善が確認されたが、より長期的な観察を通じて効果の持続性の検討が、今後の研究課題として重要であると考ええる。

【結論】本研究により、間葉系幹細胞由来エクソソームがマイクログリア活性の調節および炎症反応の緩和を介して低酸素虚血性脳障害後の神経損傷を軽減し、神経機能障害を改善することが示された。これらの知見は、将来的にエクソソームが低酸素虚血性脳障害に対する新たな治療選択肢となり得る可能性を示唆しており、さらなる検討が期待される。また、経鼻投与されたエクソソームが嗅神経に集積し、主に嗅覚路を介して時間経過とともに脳内に拡散していくことが示唆された。本投与経路は非侵襲的かつ中枢神経系への送達効率にも優れることから、今後の中枢神経疾患に対する有望な治療戦略として位置づけられる可能性がある。

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
HIBI	hypoxic-ischemic brain injury
LPS	lipopolysaccharide
MSC	mesenchymal stem cell
PBS	phosphate-buffered saline
ROI	region of interest

緒言

低酸素虚血性脳障害 (hypoxic-ischemic brain injury : HIBI) は、脳への酸素供給が不十分なために起こる病態である。脳への酸素供給が著しく低下すると、脳のあらゆる細胞が損傷を受け、長期的な神経学的影響や死に至ることさえある。HIBI は、心停止、窒息、溺水、重度の呼吸困難など様々な状況に伴って生じてくる。米国では年間推定 36 万～55 万人が心停止後に HIBI を経験している (Hosseini et al, 2020)。現在、低体温療法は心停止患者に対する唯一の有効な治療法であるが、その有効性は限られており生存率は 20～30 %、職場復帰率はわずか 9%である (Hosseini et al, 2020; Geocadin et al, 2017; Perkins et al, 2021)。極めて神経学的機能予後が不良な病態であることから、新規の治療方法の開発が急がれている。

幹細胞療法は、その潜在的な神経回復作用と免疫調節作用により、HIBI の有望な治療選択肢として検討されてきた (Liu et al, 2023)。最近の幹細胞研究の進歩により、幹細胞治療の重要な治療メカニズムのひとつがエクソソームであることが明らかになってきた。

エクソソームは脂質二重膜層からなる径 40-200 nm 程度の細胞外小胞の一種で、内部に脂質、タンパク質、マイクロ RNA、メッセンジャー RNA、DNA などを含有しており細胞間伝達の担い手として生体内に生理的に存在し、標的となる細胞に到達して生理作用を発揮する (Kosaka et al, 2010; Valadi et al, 2019; Tkach et al, 2016; Mathieu et al, 2019)。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) 由来のエクソソームは MSC 同様に中枢神経疾患を含め様々な疾患に対する治療有効性を発揮することが示唆されており、また冷凍による高い保存性能と低い免疫原性から有望な細胞外マトリックスとして注目されている。現行治療に替わる HIBI の新規治療方法の選択肢として検討されうる。

さらに、エクソソームの投与経路としては経静脈路による全身投与、局所投与などが一般的に利用されているが (Choi et al, 2022; Kawabori et al, 2012)、中枢神経系に効率的にエクソソームを送達する方法として近年経鼻投与の有効性が示唆されている。経鼻投与は血液脳関門を回避しエクソソームを中枢神経系へ直接送達可能な手法として、特に中枢神経疾患の治療において有望視されている。

局所脳虚血、外傷性脳損傷、変性疾患、機能性疾患など様々な中枢神経疾患に対する MSC 由来エクソソーム経鼻投与の有効性が報告されている

が、HIBI に関する報告はこれまでになされておらず、実験的裏付けも得られていない。

本研究では、HIBI モデルラットを用いて MSC 由来エクソソームを経鼻的に投与し、その神経機能改善効果を検討した。

方法

本研究では、7～8 週齢で体重 220-250 g の雄 Sprague-Dawley ラット（CLEA 社，東京，日本）を使用した。ラットは $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗サイクルの環境下で自由摂餌・自由飲水状態で飼育された。動物実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会の承認(承認番号 17-0065)を受け、全ての実験手順は「北海道大学動物実験に関する規定」、日本学術会議「動物実験施設指針」および「動物実験適正実施指針」に準拠して実施された。

エクソソームのソースとなる羊膜間葉系幹細胞はカネカ社(大阪，日本)から提供された(Takamiya et al, 2022)。この細胞を解凍し、 1.4×10^4 cells/mL の濃度で培地(カネカ，大阪，日本)に播種し 72 時間培養した[12]。さらに培地を無血清細胞培養培地（MEM α ，12561056, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, 米国）に交換して 48 時間培養し、エクソソームを含有する培地上清を得た。エクソソームの抽出には超遠心法を利用した。上清を $2000 \times g$ で 10 分間遠心した後、 $10,000 \times g$ で 30 分間遠心(CR21F, 日立，東京，日本)し、死細胞や細胞残屑を除去した。その後、上清を $100,000 \times g$ で 70 分間超遠心(CP-70MX, 日立，東京，日本)し、エクソソームを 50 μL のリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline :PBS)で回収した(Yuyama et al, 2019; Yuyama et al, 2020)。回収されたエクソソームの形態と粒子径は、透過型電子顕微鏡（H-7100, 日立，東京，日本）およびナノ粒子分析装置（Videodrop, Myriade, Parris, フランス）で確認した。原料となる羊膜間葉系幹細胞および抽出したエクソソームに対してそれぞれ Westernblot を行い、CD9（1:500、014-27763、富士フイルム、和光、日本）、CD63（1:500、012-27063、富士フイルム、和光、日本）、カルネキシン（1:500、ab22595、Abcam、ケンブリッジ、英国）を評価した。Westernblot 解析にあたり、各サンプルはホモジナイズ後に蛋白抽出・定量を行い、非還元条件で調整した。電気泳動後、転写、ブロッキングを経て一次抗体と反応させ、化学発光法により検出した。二次抗体は、CD9, CD63 に対しては Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (1:10000, NA-931-100UL, Cytiva, 東京，日本)、カルネキシンに対しては Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (1:10000, NA-934-100UL, Cytiva, 東京，日本)を使用した。

HIBI モデルラットは外科的に両側椎骨動脈、両側総頸動脈を遮断する 4 血管閉塞法で作製した(Lu et al, 2016)。全ての手術手順は麻酔下(2-5 %イ

ソフルラン, 30% 酸素, 70% 一酸化二窒素)にヒートパッドを用いてラットの体温を 36.5-37.5 度に維持した状態で行った。まず麻酔を導入し、ラットを腹臥位で固定して後方アプローチで両側の椎骨動脈を熱凝固により閉塞した上で切断し閉創、麻酔から覚醒させた。24 時間後に再び麻酔導入し、両側総頸動脈を血管クリップ(JAN 0883475951578, Charmant, 富山, 日本)で一時遮断後に再開通することで一過性の全脳虚血を誘導した。パイロット実験として両側総頸動脈の一時遮断時間を 10 分、20 分、30 分としてモデルラットを作成し、より実験に適したモデルを検討した。Sham 群では麻酔下に両側椎骨動脈、両側頸動脈の露出を行うのみで遮断を行わなかった。翌日まで生存した動物をその後の実験に用いた。3 日目までに体重が 25 %以上減少した動物は福祉を考慮して実験から除外し、麻酔下に安楽死させた。

動物はエクソソーム投与群と PBS 投与群の 2 群に無作為に割り付けられた。初回の投与は両側総頸動脈一時遮断からの再灌流直後に行った。エクソソームの投与 30 分前に各鼻腔に 100 単位のヒアルロニダーゼ(ナカライテスク, 京都, 日本)を 5 μ L の PBS に溶解したものを投与し鼻腔内を洗浄した。これによってエクソソームの鼻粘膜からの吸収が痂皮によって阻害されないようにした(Thomi et al, 2019)。エクソソーム群には 3×10^8 粒子のエクソソームを PBS で計 20 μ L に調整し鼻腔あたり 10 μ L ずつマイクロピペット(アズワン, 大阪, 日本)と 10 μ L ピペットチップ(アズワン, 大阪, 日本)を用いて投与した。PBS 群には各鼻腔 10 μ L ずつの PBS を投与した。その後、エクソソームの嗅球への移行を促進するために 10 分間背臥位で安静とした。同様の手順でエクソソームもしくは PBS での投与をそれぞれ 7 日間連続で行った。ラットへのヒアルロニダーゼ、エクソソーム、PBS 経鼻投与は全て麻酔下に実施した。

神経機能・行動機能評価には、Morris 水迷路試験、8 方向放射状迷路、tape removal test、Open Field test などを用いて予備実験を実施したが、環境調整や本実験における結果の解釈には 8 方向放射状迷路が最も適していると判断し採用した。8 方向放射状迷路での行動機能評価に際して、ラットは HIBI 後 5 日目から 9 日目にわたって徐々に自由体重の 85%の体重を目標に摂食制限を行った(Kurizina et al, 2020)。この間、ラットは 8 方向放射状迷路(RR-10, シンファクトリー, 福岡, 日本)および報酬となるペレット(45mg BioServ, Frenchtown, New Jersey 州, 米国)への馴化として 1 日 10 分間 8 本のアーム全てにペレットを設置した 8 方向放射状迷路内を自由に探索させた。HIBI 後 10 日目から 14 日目の 5 日間でトレーニング

セッションを実施した。8 本のアームのうち 3 本のアームにペレットを設置し、全てのペレットを回収するか 3 分間経過するまで探索させた。トレーニングセッションの間、各ラットに対してペレットを設置するアーム位置を固定とし、1 日 3 回施行した。3 分間でのペレットの獲得率、全てのペレットを回収するまでに要した移動距離、すでにペレットを食べたアームに誤って再度エントリーする作業記憶エラー、ペレットが設置されていないアームにエントリーする参照記憶エラーを記録・解析した。トレーニングセッション最終日(HIBI 後 14 日目)から 14 日後(HIBI 後 28 日目)に同様の試行を再度行い、長期記憶障害と学習記憶の保持を評価した。全ての試行ごとに迷路は 70 %エタノールで清拭消毒し、1 クール毎に迷路を回転させることで迷路自体の汚れや匂いによる内部手がかりを利用せず外部の風景とアームの位置関係からなる外部手がかりのみを利用してペレットの探索を行うことができるようにした。

エクソソームの標識は Exosparkler Exosome Membrane Labeling kit-green(同仁化学研究所, 熊本, 日本)を用いて製造元の指示通りに行った。具体的には、PBS で 100 μ L に調整したエクソソームに Protein Dye stock solution 2 μ L を加えてボルテックスで攪拌後に 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。フィルトレーションチューブに移し替え、室温で 3000 xG で 5 分間遠心した後に PBS100 μ L を加えて室温で 3000 xG で 5 分間遠心した。もう一度 PBS100 μ L を加えて 3000 xG で 5 分間遠心し、さらに残存する溶液がなくなるまで、3000 xG, 5 分間の遠心を繰り返した。PBS50 μ L をフィルトレーションチューブに加え、フィルター上の未反応色素にピペットチップの先端が触れないように注意深くピペッティングして標識されたエクソソームを回収した。この方法で標識したエクソソームの経鼻投与後 1 時間、3 時間、24 時間後にラットを犠牲にした。深麻酔下に PBS、続いて 4 %パラホルムアルデヒドで経心臓灌流してから脳を取り出した。脳は 4 %パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した後パラフィン包埋し 4 μ m の冠状切片に切り出した(Kawabori et al, 2013)。標識エクソソームの脳内分布確認のために嗅神経(bregma から 15 mm 前方)、嗅索(bregma から 5 mm 前方)、線条体(bregma 上)、中脳(bregma から 7 mm 後方)レベルでの切片を作成し、各切片に 4 つの非重複関心領域(ROI)を設定した。標識エクソソームを示す蛍光シグナルは蛍光顕微鏡の自動細胞/面積カウンター(BZ-X analyzer, キーエンス, 大阪, 日本)で測定した。各領域の自家蛍光シグナルの影響を除外するため、各領域の対照群となる標本で計測された蛍光を差し引いた。

海馬の神経細胞損傷を評価するために免疫組織化学染色を行った。神経細胞のアポトーシスと神経変性の抑制におけるエクソソームの効果を評価するために TUNEL 染色 (ApopTag Fluorescein In situ Apoptosis Detection Kit, S7110, Merck, Darmstadt, Germany) および Fluoro-Jade C 染色 (Biosensis, South Australia, Australia) を HIBI 後 3 日目の標本で実施した。神経細胞の形態評価として、急性期 (HIBI 後 3 日目) および慢性期 (HIBI 後 28 日目) にニッスル染色 (0.1 %クレシルバイオレット溶液; 武藤薬品工業, 東京, 日本) を用いて評価した。活性化したマイクログリアに対するエクソソームの効果を評価するため、Iba1 染色 (1:1500, 019-19741, 和光, 東京, 日本) を行った。(Ikenari et al, 2020; Wang et al, 2019; Yamazaki et al, 2020)。Iba1 染色の二次抗体は Alexa Fluor® 488 (1:500, ab15077, abcam, , 日本) を用いて蛍光染色を行った。

神経細胞の炎症は HIBI 後 7 日目の切片を IL-1 β (1:500, ab283818, Abcam, Cambridge, UK)、IL-6 (1:200, bs-0379R, Bioss Inc.)、TNF- α (1:1000, ab307164, Abcam, Cambridge, UK) で染色を行い評価した。二次抗体はいずれも Alexa Fluor® 488 (1:500, ab15077, abcam, Cambridge, UK) を用いて蛍光染色を行った。海馬領域に 5 つの重複しない ROI を設定し、陽性シグナル数、面積、または蛍光シグナルを自動細胞/面積カウンター (BZ-X Analyzer, 株式会社キーエンス, 大阪, 日本) を用いて測定した。

エクソソームのマイクログリア活性制御作用、炎症抑制作用を評価するために *in vitro* でマイクログリア炎症アッセイを実施した。マウス BV2 マイクログリア (Elabscience, Texas 州, 米国) を 10 %FBS と 1 %ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した MEM α で培養した。BV2 マイクログリア細胞 (2×10^4 個/ウェル) を MEM α を入れた 96 ウェルプレートに播種した。播種 24 時間後、BV2 細胞を 10 μ g/mL のリポ多糖

(lipopolysaccharide: LPS) で刺激して細胞生存率を評価し、0.1 μ g/mL の LPS で刺激して IL-6 と TNF- α 産生を評価した。細胞生存率は CCK-8 キット (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いて測定し、IL-6 と TNF- α のレベルは酵素結合免疫吸着測定 (enzyme linked immuno-sorbent assay: ELISA) キット (R&D System, Minnesota, 米国) を用いて上清中の濃度を測定した。

得られたデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計解析は JMP Pro 14 ソフトウェア (SAS Institute, North Carolina 州, 米国) を用いた。サンプル

サイズは、我々の過去の実験から比較可能な実験に基づいて選択した。一元配置分散分析では、平均値を比較するために 2 群から 10 と 10 のサンプルサイズを得た。合計 20 人のサンプルは、有意水準 0.05 の F 検定を用いて、平均が等しいという選択肢に対して、平均間の差を検出する検出力 100 %を達成する。平均値のばらつきの大きさは標準偏差で表され、0.77 であった。グループ内の共通標準偏差は 1.00 とした。検出力の計算には PASS 14.0.9 (PASS Software by NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA) を用いた。2 つの異なる群間の統計的比較は t 検定を用いて行い、3 群間の差は 1 要因分散分析 (ANOVA) 後に Turkey's HSD 検定を用いて検討した。 $p < 0.05$ の確率値を統計的に有意とみなした。

結果

・動物福祉

エクソソーム群と PBS 群の死亡率に統計的な差はなかった。しかし、本実験期間中にエクソソーム群では 3 匹、PBS 群では 2 匹のラットが体重減少のため安楽死させられた。

・パイロット実験

一過性全脳虚血時間(10 分間、20 分間、30 分間)を検討したパイロット実験において、両側総頸動脈を 10 分間遮断した場合には全脳虚血による脳機能障害が軽度であり、sham 群と差が得られなかった。20 分間遮断の場合には術中死亡が増加したが客観的に評価可能な脳機能障害が見られた。30 分間遮断の場合には死亡率が極めて高度であり動物福祉および実験の遂行に実務的な問題が生じると想定されたことから、20 分間遮断モデルをその後の本実験に用いることとした。20 分遮断したモデルでの術中死亡率は 31.8 %であった。

・エクソソーム確認、計測

透過型電子顕微鏡での観察像はエクソソームの一貫した形態を示し、平均直径は約 100 nm であった (図 1A)。さらにナノ粒子分析装置を用いて解析されたサイズ分布プロファイルでは 70~400 nm の範囲に 110 nm のピークがあることが示された (図 1B)。Western blot を行くと、AMSC 懸濁液と比較してエクソソームの特異的マーカーとして認識されている CD9 と CD63 の発現レベルが上昇していることが示された。逆に、エクソソームでの発現が低いマーカーであるカルネキシンの発現は AMSC で高度に発現しエクソソームでは減少していた。(図 1C)。これらの結果は、AMSC 由来のサンプルにエクソソームが存在することを裏付けているものと考えた。

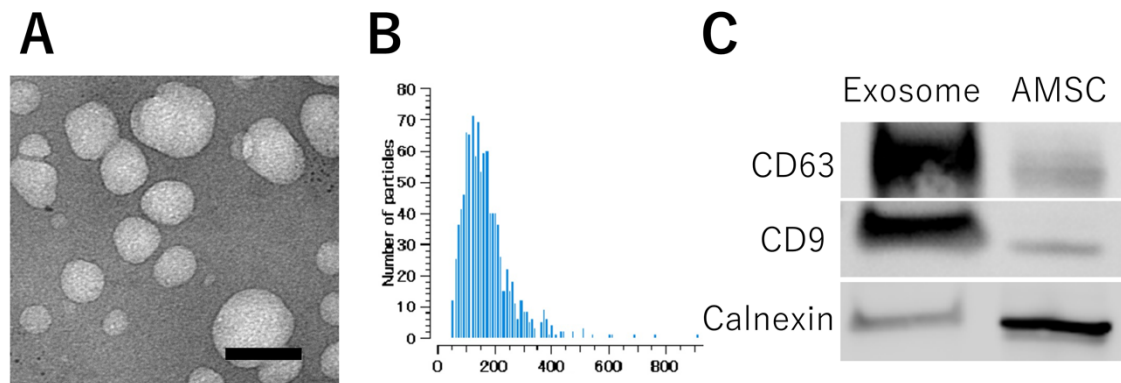


図 1. A:透過型電子顕微鏡でエクソソームを観察した像では、丸みを帯びた直径 100 nm 前後の球状の粒子が確認された。図中のバーは 100 nm を示す。B:微粒子解析装置で粒子径を計測すると、110 nm 前後に最頻値を有することが確認された。C: Western blot により、エクソソームに特異的な表面膜抗原である CD63 、CD9 が陽性であり、カルネキシンの発現は AMSC と比較して減弱していた。

・ MSC 由来エクソソーム経鼻投与により短期記憶・長期記憶障害が改善

8 方向放射状迷路を用いた空間記憶課題では、エクソソームを経鼻投与されたラットは PBS を投与された動物に比べ、Accuracy (ペレットが置かれたアームへの正しいエントリー数/アームへの全エントリー数)が優れていた (図 2)。この差は、トレーニングセッションの 5 日目(HIBI 後 14 日目)に明らかとなり、そこから 14 日後 (HIBI 後 28 日目) にも保持された。同様の傾向は Travel distance(ペレットを全て獲得するか 3 分経過するまでの移動距離)でも観察され、エクソソーム投与群では試行を重ねるごとにペレットを全て得るための移動距離が短縮しトレーニングセッションの 5 日目で明らかな差となり、14 日後にも保持された。ペレットを設置されていないアームに誤って侵入する Reference error はエクソソーム投与群でトレーニングセッション 5 日目で有意差を持って少なく、14 日後でより顕著であった。既に自身でペレットを食べたアームへの再進入を示す working error もエクソソーム群で少ない傾向があり、その差は 28 日目で有意であった。これらの結果は、MSC 由来エクソソーム経鼻投与により HIBI ラットに生じている短期および長期の記憶障害を改善したことを示唆している。

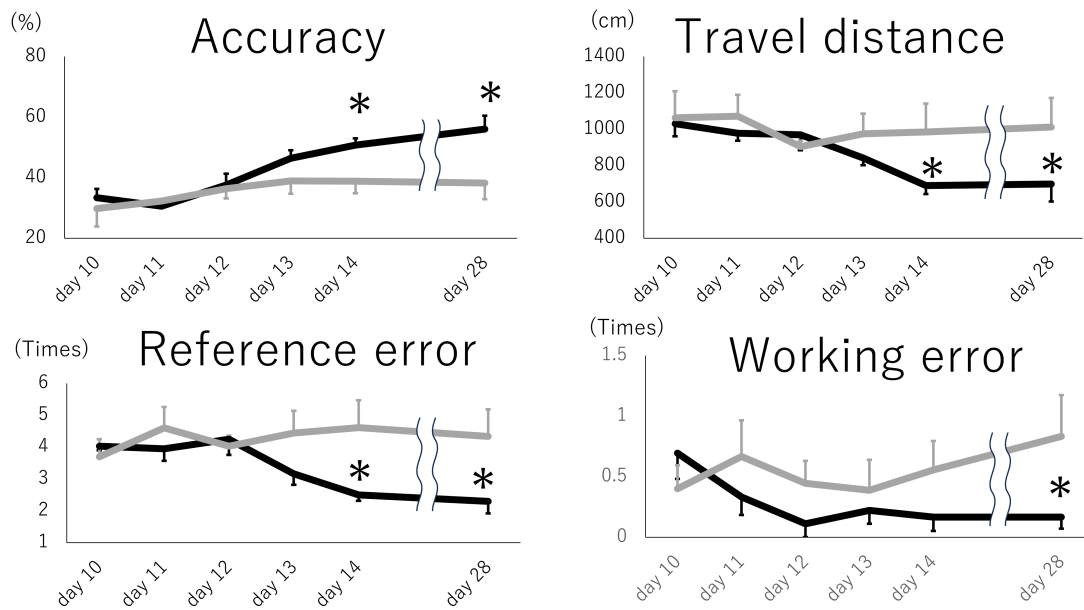


図 2. Accuracy(正しくペレットを獲得した数/全てのアームへのエントリー回数)：いずれの群もトレーニングセッションの開始時では正答率が低いですが、エクソソーム群では回数を重ねる毎に向上し、5 日目では PBS に群と明らかな差が生じた。この差は 14 日後に実施した試行でも保持された。Travel distance(全てのペレットを獲得するか 3 分間経過するまでに移動した距離)：エクソソーム群では試行を重ねるごとに距離が短縮し、より効率的にペレットを獲得できるようになり、PBS 群と差を生じた。Reference error(ペレットが設置されていないアームへのエントリー数)：エクソソーム群ではトレーニングを重ねるにつれてエラー数が減少し、PBS 群と差が生じた。これは 14 日後に実施した試行でも同様であった。Working error(既にペレットを獲得済みのアームへの再エントリー)：エクソソーム群でエラー数が少ない傾向がみられた。PBS 群との差はトレーニングセッション終了 14 日後の時点でもより明らかであった。

・経鼻投与されたエクソソームの脳内分布

嗅神経、嗅索、線条体および中脳におけるエクソソームの分布を蛍光イメージングを用いて評価した (図 3)。蛍光標識したエクソソームを経鼻投与して 1 時間後にはエクソソームと考えられる蛍光シグナルが嗅神経で多く観察された (約 250 シグナル/mm²)。嗅索、線条体、中脳でも、嗅神経よりは少ないものの蛍光シグナルが認められ、これらの領域のシグナルは一貫して投与 3 時間後で 1 時間後時点よりも増加し、投与 24 時間後ではより

増加していた。すなわち、経鼻投与された MSC 由来エクソソームは HIBI ラットにおいて、嗅神経路を経由して脳内に拡散していった可能性が示唆された。

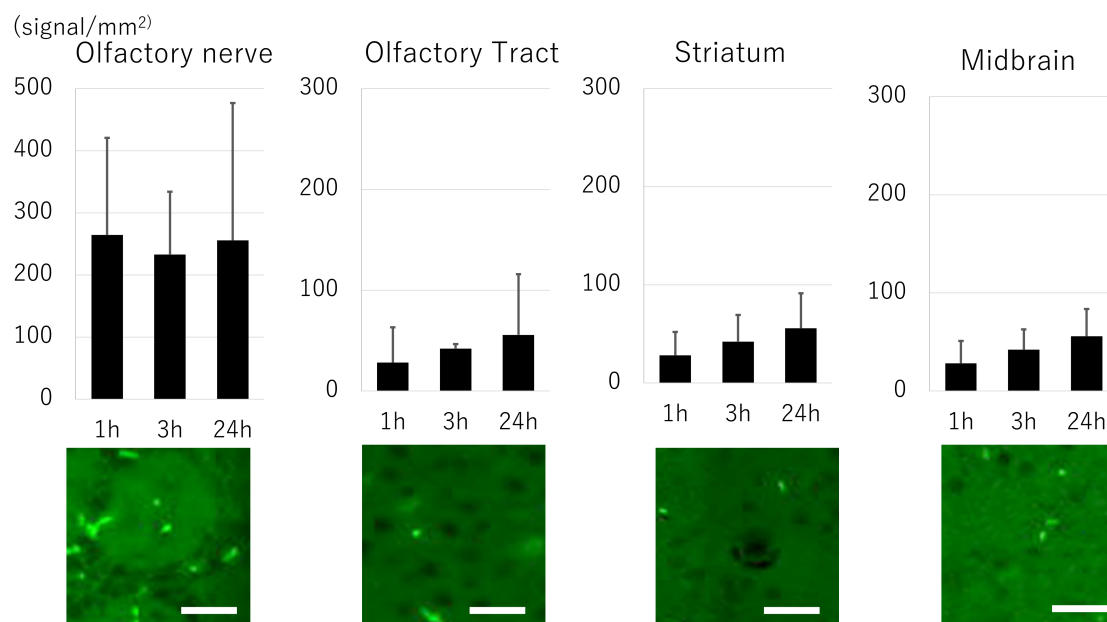


図 3. 蛍光標識した MSC 由来エクソソームを経鼻投与後 1 時間、3 時間、24 時間後の脳の各部位での蛍光シグナルを測定した。投与 1 時間後の時点で嗅神経では相当の蛍光シグナルの集積を認めた。脳の他の部位では、3 時間後、24 時間後と時間経過とともに蛍光シグナルの集積が増加していった。

・ MSC 由来エクソソームは CA1 領域の神経障害を軽減した

海馬、特に CA1 領域は記憶障害に重要な役割を果たすことが知られており、HIBI によって大いに影響を受ける。エクソソーム経鼻投与の機能的メカニズムを調べるため、神経細胞のアポトーシスと神経変性について評価した。HIBI 後 7 日目に犠牲にしたラット標本の TUNEL 染色では、PBS 投与群で全脳性に TUNEL 陽性を示す細胞が散在しており、虚血に脆弱とされる CA1 領域では特に顕著であった。(図 4A)。これに対してエクソソーム群では TUNEL 陽性を示す細胞の出現は少なかった。蛍光シグナルを測定すると PBS 群との差は明らかであった。神経の変性や壊死を評価するために行った Fluoro-Jade-C 染色では、PBS 群の海馬 CA1 領域に陽性を示す細胞が豊富に見られたが、エクソソーム投与群では陽性細胞の出現は限局的であった。(図 4B)これらのことから、MSC 由来エクソソーム経鼻投与により HIBI 後の CA1 領域の神経細胞のアポトーシス、壊死、変性が抑えられたこ

とが示唆されたと考えた。

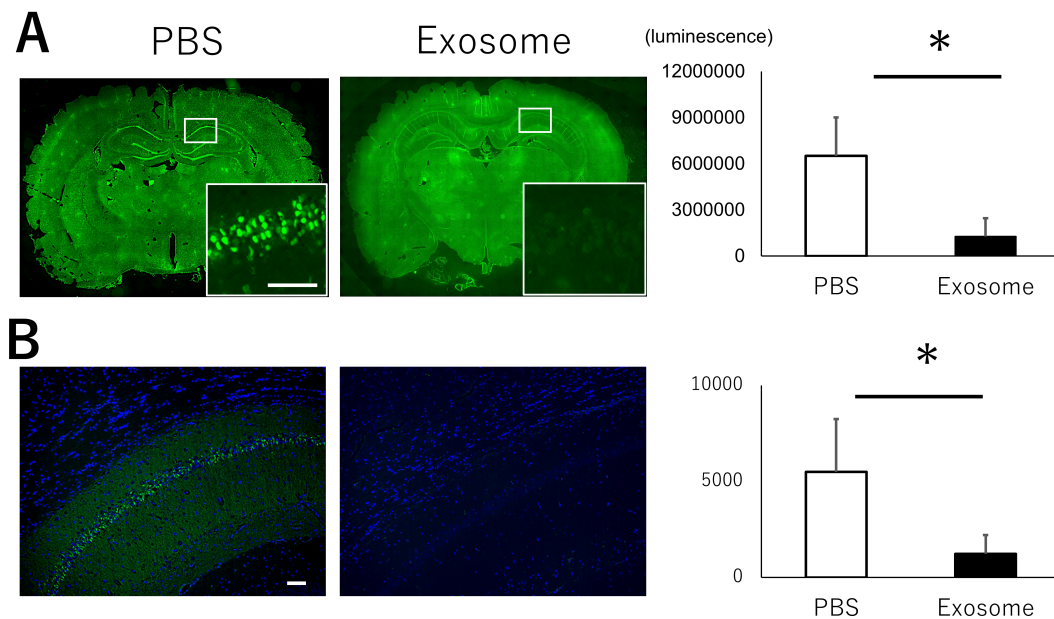


図 4. A: TUNEL 染色によりアポトーシスを評価した。PBS 群では散在性に陽性細胞が見られ、特に CA1 に顕著であった。対してエクソソーム群では陽性細胞は少なく、測定すると PBS 群との差は明らかであった。B: Fluoro-Jade-C 染色を行うと PBS 群群で CA1 領域に陽性細胞が多数出現していたのに対し、エクソソーム群では陽性細胞は少なかった。

・MSC 由来エクソソーム経鼻投与は CA1 神経細胞の生存率を向上させた

HIBI 後の神経細胞の評価のためにニッスル染色を実施した。ニッスル染色により、PBS 群では CA1 領域錐体細胞の構造が破綻し凝集した核が乱れて配列しているのが確認されたが、エクソソーム群では細胞形態・配列が保たれている状態であった。この観察は急性期だけでなく、HIBI 後 14 日目と 28 日目に観察された亜急性期～慢性期でも明らかであった (図 5)。これらの結果は、MSC 由来エクソソーム経鼻投与が海馬の神経細胞生存率を回復させ、神経機能障害の軽減に寄与した可能性を示す。

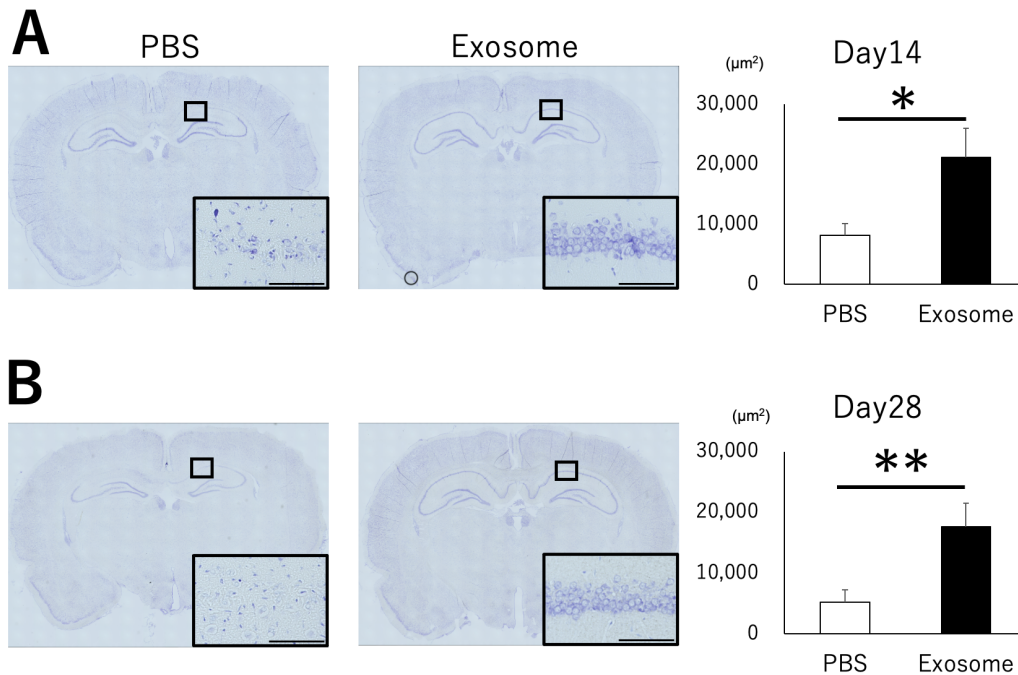


図 5. A: HIBI 後 14 日目の時点で、PBS 群では CA1 の錐体細胞の構造・配列が破綻しているのに対して、エクソソーム投与群では保たれていることが確認された。B: HIBI 後 28 日目では PBS 投与群では CA1 錐体細胞の構造・配列の変化がより進んでいたが、エクソソーム群ではこれが保たれたままであったためその差がより明白となった。

・MSC 由来エクソソーム経鼻投与によりマイクログリアの活性化が抑えられた

神経炎症は神経障害の原因となる機序のうち極めて重要な要素であることから、海馬におけるマイクログリアの活性を調べた。マイクログリアに特異的な Iba1 染色を行うと、PBS 群では海馬 CA1 領域においてマイクログリアの増殖とアメーバ状に膨張した活性型マイクログリアへの形質転換がとされる所見が見られたが、エクソソーム群ではこの変化が有意に抑制された (図 6、上段と左下)。さらに、蛍光標識したエクソソームを投与した個体のサンプルに Iba1 染色を行い観察すると、Iba1 陽性を示すマイクログリアとエクソソームの蛍光シグナルが共局在することが確認された。これらのことから、エクソソームはマイクログリアに作用しこの活性化を制御した可能性が示唆された (図 6、右下)。

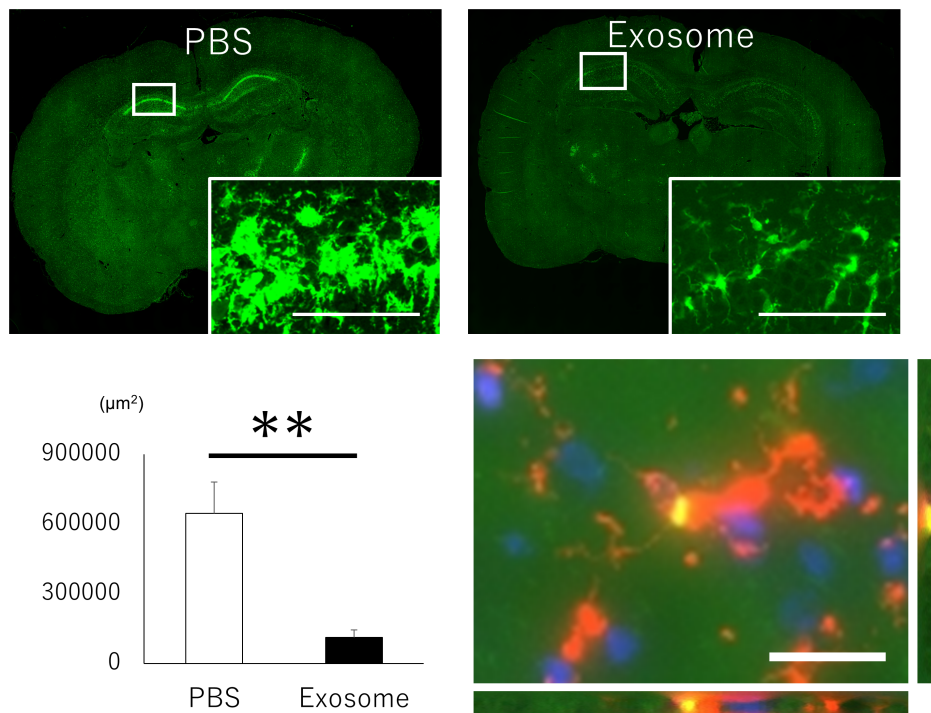


図 6. 神経炎症の評価のために、マイクログリアに特異的な Iba1 染色を行った。PBS 群ではアメーバ状に腫大した活性化マイクログリアが多数出現していたが、エクソソーム投与群ではそのような変化が少なかった(上段左右、下段左)。蛍光標識をしたエクソソーム(緑)を経鼻投与したラット標本を Iba1(赤)染色したものの共焦点画像では、マイクログリアとエクソソームの共局在が確認された。

・MSC 由来エクソソーム投与により、炎症性サイトカインの発現が抑制された

エクソソームの抗炎症作用をさらに調べるために、炎症性サイトカインを評価した。その結果、エクソソームを経鼻投与されたラットは PBS を経鼻投与されたラットと比較して海馬における IL-1 β 、IL-6 および TNF- α いずれも発現量が少ない傾向がみられた (図 7)。これらの知見は、AMSC 由来エクソソームの経鼻投与がマイクログリア由来の神経炎症の緩和に働いたことを示唆していると考えた

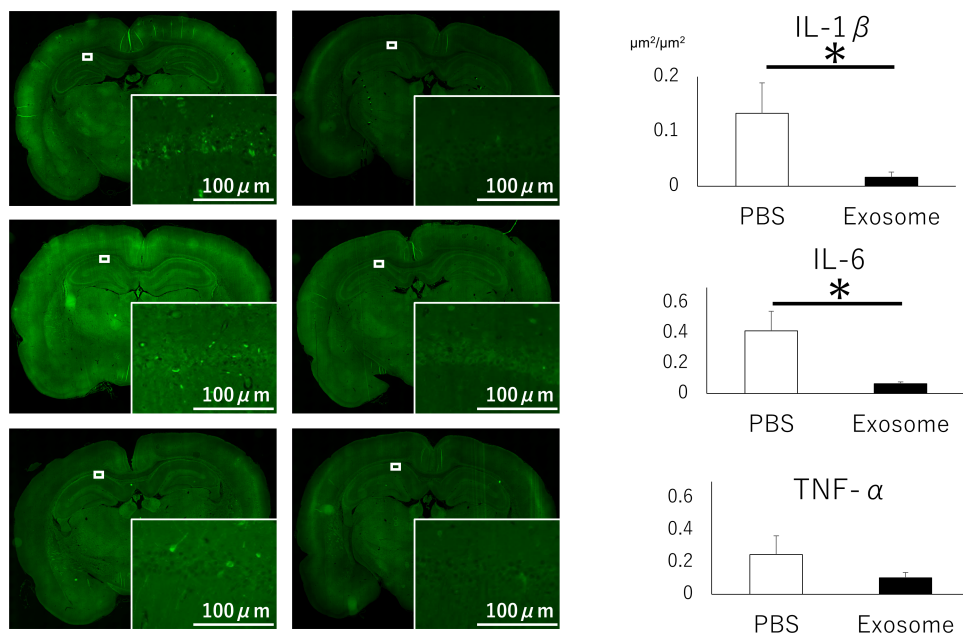


図 7. IL-1 β (上段)、IL-6(中段)、TNF- α (下段)の蛍光免疫染色を行い、計測した。いずれも PBS 投与群(左)と比較してエクソソーム投与群(右)で発現が少ない傾向が見られた。

・エクソソームは BV2 細胞に作用し炎症性サイトカイン発現を抑制した
マウス由来マイクログリア BV2 細胞を用いた *in vitro* モデルでマイクログリアに対するエクソソームの抗炎症作用をさらに検討した。LPS の投与は対照群と比較して BV2 細胞の生存率を有意に低下させたが、エクソソームの添加は生存率を顕著に逆転させた (図 8A)。さらに、IL-6 産生は LPS 刺激により有意に上昇したが、エクソソーム投与はその発現を逆転させることに成功した (図 8B)。TNF- α についても同様の傾向が観察された (図 8C)。これらのデータは、エクソソームが BV2 細胞に作用し抗炎症作用を発揮したことを示しているものと考えられた。

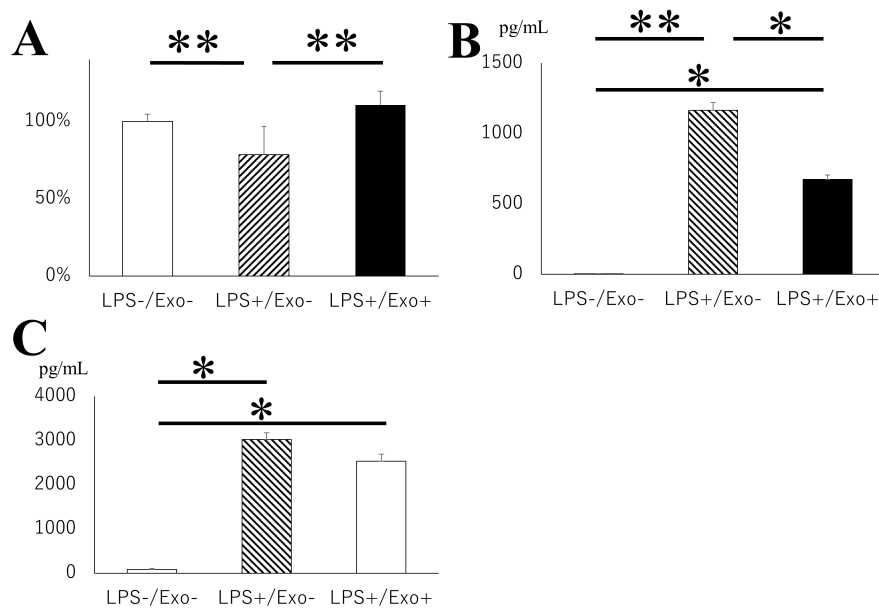


図 8. エクソソームによるマイクログリア活性調節、炎症抑制効果の検討のため、マウス BV2 マイクログリア細胞を用いた In-Vitro assay を行った。
 A: マイクログリア自体の生存率は LPS 刺激により低下したが、エクソソームを投与することで改善した。B: IL-6 の発現量は LPS 刺激を行わないとほとんど見られなかったが、LPS 刺激により大幅に増大し、エクソソーム添加により減少に転じた。C: TNF- α の発現量も、LPS 刺激で増大したがエクソソームを加えることで減少傾向が見られた。

考察

本研究では、AMSC 由来のエクソソームを経鼻的に投与すると、1 時間後にはエクソソームが嗅神経に集積し、その後 24 時間まで継続的に脳内に増加していくことが示された。さらに、エクソソームの作用によりマイクログリア由来の炎症を緩和し神経障害を軽減することで、結果として神経機能の改善が得られることが示唆された。

短期・長期記憶障害を含む高次脳機能障害は、HIBI から生還した患者にとって最も重大な後遺症であり、海馬の CA1 領域の損傷がこれらの症状の原因と考えられている (Zook et al, 2022; Moulaert et al, 2009; Yang et al, 2020; Byron-Alhassan et al, 2020, Tortora et al, 2023; Tanaka et al, 2022; Saccaro et al, 2021)。急性障害の結果としての虚血性障害に対する CA1 神経細胞の脆弱性に加えて、最近の報告ではマイクログリアにより誘導される炎症反応も最初の障害から 2-3 日後に生じてくる遅発性神経細胞死に寄与する可能性がある (Bartsch et al, 2015)。したがって、神経認知機能を改善するためのレスキューターゲットの一つとして海馬における遅発性神経細胞死が注目されている。海馬への前駆細胞の神経細胞移植と、Klf4、Sox2、Oct4、c-Myc の再プログラム因子による神経新生が高次脳機能の回復に寄与したという報告から認知機能における海馬修復の重要性が強調されている (Meyer et al, 2020; Wi et al, 2016; Nakano et al, 2016)。

本実験では MSC 由来のエクソソームは海馬 CA1 領域の神経損傷を抑制することに成功した。MSC 由来エクソソームの神経保護作用としては、抗アポトーシス作用、アストロサイト/マイクログリアの不活性化、血液脳関門の保全、神経新生、シナプス形成など、複数の治療メカニズムが報告されている。その中でもマイクログリアの不活性化は近年注目されている。Chen らは、脂肪由来 MSC に内包された Circular RNA SCMH1 がマイクログリアの M2 極性を達成することを報告し、他の研究者は、循環 RNA リボソームタンパク質 S5 (circ-Rps5) またはマイクロ RNA-233-3p が M2 極性化の原因であることを報告している (Chen et al, 2023; Zhao et al, 2020; Yang et al, 2022)。これらのデータは、本実験で得られたエクソソームが海馬の神経細胞損傷を軽減し、神経認知機能障害を緩和する可能性があるという結果と一致していた。他のメカニズムも報告されている。Chen らは、エクソソームの静脈内移植により、2'、3'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼをカプセル化したエクソソームによって神経新生と神経細胞新生が達成されることを示し、Nakano らは、アストロサイトと神経細胞におけるミ

トコンドリアの形態異常がエクソソーム移植によって改善され、その結果認知機能が回復することを示した(Nakano et al, 2016; Chen et al, 2020)。エクソソームの正確な分子メカニズムを完全に解明するには、さらなる評価が必要であるが、海馬損傷に対するエクソソームの回復可能性は研究する価値がある。

中枢神経へのエクソソームの送達路としては、いくつかの投与経路がこれまで検討されてきた。静脈内投与は脳内／髄腔内投与に比べて侵襲が少ないという利点があるが、静脈内に投与されたエクソソームのほとんどが肝臓、肺、脾臓に蓄積し、その結果脳に到達するのは約 0.00～0.01 %に留まり、脳への到達という点では効率性に課題があった(Choi et al, 2022)。近年の報告では鼻腔内投与が中枢神経へのより低侵襲かつ効果的な送達経路として認識されつつある(Herma et al, 2021; Tolomeo et al, 2023)。静脈内投与の場合、投与から 24 時間後には投与されたエクソソームのいずれも脳内で検出されないと報告されるのとは対照的に、鼻腔内投与では多量のエクソソームが脳内に検出されることが知られている(Betzer et al, 2017)。エクソソームは 100-200 nm と非常に小さいことから、鼻腔内に投与すると嗅球や三叉神経を介して脳内に送達される。鼻腔内投与には細胞内輸送、細胞外輸送という 2 つの異なる輸送形態が関与していることが報告されている(Dhuria et al, 2010)。細胞内輸送には、嗅覚ニューロンまたは三叉神経ニューロンの嗅覚感覚ニューロンへのエンドサイトーシスが関与し、次いで軸索に沿って篩状板を通して嗅球、または直接大脳へ輸送される。アルツハイマー病モデルマウスに経鼻的に送達された PKH 標識 MSC 由来エクソソームの大部分は、嗅球または大脳皮質に直接輸送されることが示されたという報告もある。エクソソームはさらに、篩状板を通過して糸球体に集中し、その後、僧帽細胞へと進行し、その後、脳深部へと輸送されることが報告されている(Ma et al, 2020)。細胞外経路には、血管周囲の輸送系が関与している。エクソソームは鼻粘膜の血管を通して前膜の薄層で全身循環に入るか、あるいは嗅覚被膜細胞を通して脳脊髄液に入り、その後中枢神経系の血管に到達する。エクソソームは血液脳関門を通過することができるため、受容体を介した細胞外輸送やエンドサイトーシスによって脳の炎症部位に到達することが可能となる。これらの理論と一致するように、われわれは嗅球で大量の標識エクソソームを発見した。これは、Betzer らが経鼻投与したエクソソームを追跡するために金ナノ粒子を利用し、投与後 24 時間まで脳内の粒子数が継続的に増加し、そのほとんどが炎症部位周辺に集積することを見出した別の報告と一致している(Betzer et al, 2017)。エクソソームの障害部位へのホーミ

ング機構が炎症主導型であるという報告を考慮すると、この方法は強い炎症を引き起こす急性脳疾患への治療アプローチとして理想的である。エクソソームの経鼻投与は、虚血性脳梗塞、外傷性脳損傷、周産期脳梗塞、脳出血、脳卒中など、さまざまな神経疾患モデルに有効であることが動物実験レベルでは報告されている(Gotoh et al, 2024)。さらに、国外では MSC 由来のエクソソーム経鼻投与を用いた 3 つの臨床試験が進行中であり、それぞれてんかん(NCT:05886205)、アルツハイマー病(NCS04388982)、早産(NCT:05490173)を対象疾患としている。これらの結果が明らかになることで、よりヒトへの臨床応用を含めた適応可能性の検討がより進むものと考ええる。

投与されたエクソソームの脳内での分布を正確に追跡する方法は、投与経路の検討の上で重要な課題である。本研究で著者らは、市販のエクソソーム標識キットを利用した。PHK 親油性色素は、露出した脂質二重層に脂肪族領域をインターカレートすることで得られる高い蛍光性と安定性のため脳内のエクソソームの分布を観察・追跡するために一般的に採用されているが、これらの色素はナノ粒子を形成する可能性があり、偽陽性シグナルを引き起こしたりエクソソームのサイズを変化させたりする可能性があり、それによって細胞への取り込みや生体内分布に影響を及ぼす可能性がある(Dehghani et al, 2020; Puzar et al, 2018)。本研究で使用した色素は凝集が少なく、エクソソームの特性への影響が最小限であることが報告されており、エクソソームの動態をより正確に観察することが可能である(Holthaus, 1988)。

本研究には考慮すべきいくつかの限界がある。第一に、脳内に移行したエクソソームの正確な数は定量できなかった。エクソソームを市販の蛍光色素で標識したが、これは頭蓋骨を透過する波長が短い。蛍光シグナルを切片間で比較することはできるが、エクソソームの総数を定量的に測定することはできない。脳内でのエクソソームの正確な粒子数の分布・局在を明らかにするには、同位体標識などの定量化可能な方法を用いる必要がある。第二に、マイクログリアの活性化を抑制するエクソソーム内の生理活性物質を特定することができなかった。mir760-3p、342-3p、330-3p などの miRNA は、マイクログリアの不活性化に寄与することが報告されている(Wang et al, 2023; Upadhyay et al, 2020; Tanaka et al, 2023)。我々の研究室の以前の報告でも、mir125a-3p が好中球の不活性化を通じて抗炎症作用を示すことが示されている(Morishima et al, 2024)。治療効果の評価には、マイクロアレイとリアルタイム PCR が必要である。第 3 に、我々は 28 日間以上の神経学的障害を追跡することができなかった。機能回復についてさらに深く検討し理解するためには、より長い期間モニターすることが重要であると考ええる。

結論

① 本研究から得られた新知見

- ・間葉系幹細胞由来エクソソームは、マイクログリア活性の調整と炎症緩和により HIBI 後の CA1 領域の神経障害を軽減しこれが低酸素虚血性脳障害後の神経機能障害を改善することに寄与したことが示された
- ・経鼻投与されたエクソソームが嗅神経路を介して脳内に拡散していったことが、簡便なエクソソーム膜標識蛍光キットを用いて示された。

② 新知見の意義

まず、有効な介入方法が極めて限られており神経学的機能予後が不良である HIBI の病態に対して新たに現実的な治療選択肢の候補が提示されたという点に意義があると考ええる。

また、間葉系幹細胞由来エクソソームがマイクログリア活性の調節を介して抗炎症作用を呈することは他の疾患に対する研究では報告があるものの、HIBI においても神経保護、神経機能改善に働いたという知見は HIBI に対する今後の治療法研究において有望な方向性を示唆するものであり、本実験で用いた間葉系幹細胞由来エクソソーム以外を用いた HIBI 治療方法の研究や病態の理解にも寄与するという意義があるものと考ええる。

さらに、経鼻投与された間葉系幹細胞由来エクソソームが嗅神経に高集積を示したあと経時的に脳全体に拡散していったことが市販のキットを用いて簡便な標識方法、測定方法で観察されたという点にも意義がある。

同位体標識などの手法を用いずとも簡易的にエクソソームの生体内分布を把握する手法であることが示されたためである。

- ### ③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか
- まず、HIBI に対する治療という観点から言うと、今回 HIBI に対して治療有効性が示された間葉系幹細胞由来エクソソームがマイクログリアや神経細胞に作用した経路や機序を追求することで、さらに効率的で有効な治療方法の開発に寄与するものと考ええる。
- エクソソームは内部に核酸、蛋白質、脂質など生理活性物質を豊富に

含んでおり、これのうちいずれが主に作用したかを特定することで新たな治療薬開発につながる可能性がある。

また、経鼻投与が中枢神経疾患に対するエクソソームの投与経路として有望であるという知見が一つ積み重なったことで、HIBI 以外の神経難病治療においても間葉系幹細胞由来エクソソームの経鼻投与が有効な治療方法の選択肢として検討されうる。

④ 今後の課題

本実験では間葉系幹細胞由来エクソソームが内含する生理活性物質のうち、いずれが主に作用したかの特定に至らなかった。今後マイクロアレイやリアルタイム PCR を用いてさらなる検討の余地が残っているものと考ええる。

今回は Sprague-Dawley ラットを用いた実験でエクソソーム経鼻投与の有望性が示されたが、ラットの嗅神経はヒトと比較して非常に発達しており、ヒトを対象としたときに経鼻投与したエクソソームの吸収率や脳内への移行率が治療有効性を示す程度に得られるかという点には懸念が残る。今回は経鼻投与されたエクソソームの脳内移行を簡便な方法で観察することに成功したが、脳内に到達したエクソソームの粒子数の定量化には至っていない。今後は、同位体標識など定量可能な方法でエクソソームの脳内移行率を把握することが、ヒトを対象とした際の投与量の設定などに際した課題であると考ええる。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Bartsch T, Dohring J, Reuter S, Finke C, Rohr A, Brauer H, Deuschl G and Jansen, O (2015) Selective Neuronal Vulnerability of Human Hippocampal Ca1 Neurons: Lesion Evolution, Temporal Course, and Pattern of Hippocampal Damage in Diffusion-Weighted Mr Imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 35, 1836–1845.
- Betzer O, Perets N, Angel A, Motiei M, Sadan T, Yadid G, Offen D and Popovtzer R (2017) In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 11, 10883–10893.
- Byron-Alhassan A, Tulloch H.E, Collins B, Quinlan B, Fang Z, Chakraborty S, Le May M, Duchesne L and Smith AM (2020) Exploratory Analyses of Cerebral Gray Matter Volumes after out-of-Hospital Cardiac Arrest in Good Outcome Survivors. *Front. Psychol.* 11, 856.
- Chen ,SY, Lin MC, Tsai JS, He PL, Luo WT, Chiu IM, Herschman HR and Li HJ (2020) Exosomal 2',3'-Cnp from Mesenchymal Stem Cells Promotes Hippocampus Ca1 Neurogenesis/Neuritogenesis and Contributes to Rescue of Cognition/Learning Deficiencies of Damaged Brain. *Stem Cells Transl. Med.* 9, 499–517.
- Chen S, Wang X, Qian Z, Wang M, Zhang F, Zeng T, Li L and Gao L (2023) Exosomes from Adscs Ameliorate Nerve Damage in the Hippocampus Caused by Post Traumatic Brain Injury Via the Delivery of Circ-Scmh1 Promoting Microglial M2 Polarization. *Injury*, 54, 110927.
- Choi H, Kim MY, Kim DH, Yun H, Oh BK, Kim SB, Song IH, Park HS, Kim SE, Park C, et al. (2022) Quantitative Biodistribution and Pharmacokinetics Study of Gmp-Grade Exosomes Labeled with (89)Zr Radioisotope in Mice and Rats. *Pharmaceutics*, 14, 1118.
- Dehghani M, Gulvin SM, Flax J and Gaborski TR (2020) Systematic Evaluation of Pkh Labelling on Extracellular Vesicle Size by Nanoparticle Tracking Analysis. *Sci. Rep.* 10, 9533.

Dhuria SV, Hanson LR and Frey WH (2010) 2nd. Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations. *J. Pharm. Sci.* 99, 1654–1673.

Geocadin RG, Wijdicks E, Armstrong MJ, Damian M, Mayer SA, Ornato JP, Rabinstein A, Suarez JJ, Torbey MT, Dubinsky RM et al. (2017) Practice Guideline Summary: Reducing Brain Injury Following Cardiopulmonary Resuscitation: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 88, 2141–2149.

Gotoh S, Kawabori M and Fujimura, M (2024) Intranasal Administration of Stem Cell-Derived Exosomes for Central Nervous System Diseases. *Neural Regen. Res.* 19, 1249–1255.

Herman S, Fishel I and Offen D (2021) Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles for the Treatment of Neurological Diseases. *Stem Cells*, 39, 1589–1600.

Holthaus, D. (1988) Illinois Denies Tax Exemptions to Subsidiaries. *Hospitals*, 62, 57.

Hosseini M, Wilson RH, Crouzet C, Amirhekmat A, Wei KS and Akbari Y (2020) Resuscitating the Globally Ischemic Brain: Ttm and Beyond. *Neurotherapeutics*, 17, 539–562.

Ikenari T, Kurata H, Satoh T, Hata Y and Mori T (2020) Evaluation of Fluoro-Jade C Staining: Specificity and Application to Damaged Immature Neuronal Cells in the Normal and Injured Mouse Brain. *Neuroscience*, 425, 146–156.

Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y and Tamaki N (2012) Intracerebral, but Not Intravenous, Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells Enhances Functional Recovery in Rat Cerebral Infarct: An Optical Imaging Study. *Neuropathology*, 32, 217–226.

Kawabori M, Hokari M, Zheng Z, Kim JY, Calosing C, Hsieh CL, Nakamura MC

and Yenari MA (2013) Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 Correlates to Hypothermic Neuroprotection in Ischemic Stroke. *Ther. Hypothermia Temp. Manag.* 3, 189–198.

Kosaka N, Iguchi H and Ochiya T (2019) Circulating Microrna in Body Fluid: A New Potential Biomarker for Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancer Sci.* 101, 2087–2092.

Kurzina NP, Aristova IY, Volnova AB and Gainetdinov RR (2020) Deficit in Working Memory and Abnormal Behavioral Tactics in Dopamine Transporter Knockout Rats during Training in the 8-Arm Maze. *Behav. Brain Res.* 390, 112642.

Liu X and Jia X (2023) Neuroprotection of Stem Cells against Ischemic Brain Injury: From Bench to Clinic. *Transl. Stroke Res.* 15, 691-713.

Lu D, Wu Y, Qu Y, Shi F, Hu J, Gao B, Wang B, Gao G, He S and Zhao T (2016) A Modified Method to Reduce Variable Outcomes in a Rat Model of Four-Vessel Arterial Occlusion. *Neurol. Res.* 38, 1102–1110.

Ma X, Huang M, Zheng M, Dai C, Song Q, Zhang Q, Li Q, Gu X, Chen H, Jiang G et al. (2020) Adscs-Derived Extracellular Vesicles Alleviate Neuronal Damage, Promote Neurogenesis and Rescue Memory Loss in Mice with Alzheimer's Disease. *J. Control Release.* 327, 688–702.

Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G and 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.

Meyer P, Grandgirard D, Lehner M, Haenggi M and Leib SL (2020) Grafted Neural Progenitor Cells Persist in the Injured Site and Differentiate Neuronally in a Rodent Model of Cardiac Arrest-Induced Global Brain Ischemia. *Stem. Cells Dev.* 29, 574–585.

Moulaert VR, Verbunt JA, van Heugten CM and Wade DT (2009) Cognitive Impairments in Survivors of out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Systematic

Review. *Resuscitation*, 80, 297–305.

Morishima Y, Kawabori M, Yamazaki K, Takamiya S, Yamaguchi S, Nakahara Y, Senjo H, Hashimoto D, Masuda S, Fujioka Y et al (2024) Intravenous Administration of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Alleviates Spinal Cord Injury by Regulating Neutrophil Extracellular Trap Formation through Exosomal Mir-125a-3p. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2406.

Nakano M, Nagaishi K, Konari N, Saito Y, Chikenji T, Mizue Y and Fujimiya M (2016) Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Diabetes-Induced Cognitive Impairment by Exosome Transfer into Damaged Neurons and Astrocytes. *Sci. Rep.* 6, 24805.

Perkins GD, Callaway CW, Haywood K, Neumar RW, Lilja G, Rowland MJ, Sawyer MN, Skrifvars MB and Nolan JP (2021) Brain Injury after Cardiac Arrest. *Lancet*, 398, 1269–1278.

Puzar DP, Stenovec M, Sitar S, Lasic E, Zorec R, Plemenitas A, Zagar E, Kreft M and Lenassi M (2018) Pkh26 Labeling of Extracellular Vesicles: Characterization and Cellular Internalization of Contaminating Pkh26 Nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*, 1860, 1350–1361.

Saccaro LF, Schilliger Z, Perroud N and Piguet C (2021) Inflammation, Anxiety, and Stress in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biomedicines* 9, 1313.

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.

Tanaka M, Spekker E, Szabo A, Polyak H and Vecsei L (2022) Modelling the Neurodevelopmental Pathogenesis in Neuropsychiatric Disorders. *Bioactive Kynurenines and Their Analogues as Neuroprotective Agents-in Celebration*

of 80th Birthday of Professor Peter Riederer. *J. Neural Transm*, 129, 627–642.

Tanaka M, Szabo A, Vecsei L and Gimenez-Llort L (2023) Emerging Translational Research in Neurological and Psychiatric Diseases: From In Vitro to In Vivo Models. *Int. J. Mol. Sci* 24, 15739.

Thomi G, Joerger-Messerli M, Haesler V, Muri L, Surbek D and Schoeberlein A (2019) Intranasally Administered Exosomes from Umbilical Cord Stem Cells Have Preventive Neuroprotective Effects and Contribute to Functional Recovery after Perinatal Brain Injury. *Cells* 8, 855.

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

Tolomeo AM, Zuccolotto G, Malvicini R, De LG, Penna A, Franco C, Caicci F, Magarotto F, Quarta S, Pozzobon M et al. (2023) Biodistribution of Intratracheal, Intranasal, and Intravenous Injections of Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in a Mouse Model for Drug Delivery Studies. *Pharmaceutics* 15, 548.

Tortora F, Hadipour AL, Battaglia S, Falzone A, Avenanti A and Vicario CM (2023) The Role of Serotonin in Fear Learning and Memory: A Systematic Review of Human Studies. *Brain Sci* 13, 1197.

Upadhyia R, Madhu LN, Attaluri S, Gitai DLG, Pinson MR, Kodali M, Shetty G, Zanirati G, Kumar S, Shuai B et al. (2020) Extracellular Vesicles from Human Ipsc-Derived Neural Stem Cells: Mirna and Protein Signatures, and Anti-Inflammatory and Neurogenic Properties. *J. Extracell. Vesicles* 9, 1809064.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ and 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, Kawabori M and Houkin K (2019) Fty720 (Fingolimod) Ameliorates

Brain Injury through Multiple Mechanisms and Is a Strong Candidate for Stroke Treatment. *Curr. Med. Chem* 27, 2979–2993

Wang Y, Niu H, Li L, Han J, Liu Z, Chu M, Sha X and Zhao J (2023) Anti-Chac1 Exosomes for Nose-to-Brain Delivery of Mir-760-3p in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Mice Inhibiting Neuron Ferroptosis. *J. Nanobiotechnol* 21, 109.

Wi S, Yu JH, Kim M, Cho SR (2016) In Vivo Expression of Reprogramming Factors Increases Hippocampal Neurogenesis and Synaptic Plasticity in Chronic Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Neural Plast* 2016, 2580837.

Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Takamiya S, Tateno T, Konno K, Watanabe M and Houkin K (2020) 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.

Yang H, Tu Z, Yang D, Hu M, Zhou L, Li Q, Yu B and Hou, S (2022) Exosomes from Hypoxic Pre-Treated Adscs Attenuate Acute Ischemic Stroke-Induced Brain Injury Via Delivery of Circ-Rps5 and Promote M2 Microglia/Macrophage Polarization. *Neurosci. Lett* 769, 136389.

Yang S, Wang X, Gu H, Wang D, Guan T, Liao W and Peng X (2020) Prognostic Value of Magnetic Resonance Imaging Performed during the Subacute Phase in Adult Patients with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy for Long-Term Neurological Outcomes. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis* 29, 104950.

Yuyama K, Takahashi K, Usuki S, Mikami D, Sun H, Hanamatsu H, Furukawa J, Mukai K and 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 and Igarashi Y (2020) Lysosomal-Associated Transmembrane Protein 4b Regulates Ceramide-Induced Exosome Release. *FASEB J* 34, 16022–16033.

Zhao Y, Gan Y, Xu G, Hua K and Liu D (2020) Exosomes from Mscs Overexpressing Microrna-223-3p Attenuate Cerebral Ischemia through Inhibiting Microglial M1 Polarization Mediated Inflammation. *Life Sci* 260, 118403.

Zook N, Voss S, Nordstrom EB, Brett SJ, Jenkinson E, Shaw P, White P and Bengner J (2022) Neurocognitive Function Following out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Systematic Review. *Resuscitation* 170, 238–246.