HOKKAIDO UNIVERSITY

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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

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　池田　拓磨

学 位 論 文 題 名

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)

【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 μL 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-1β、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 100nm の球状構造を示し、粒径分布では約 110nm 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経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た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。