



Title	くも膜下出血に対する幹細胞由来のエクソソーム経鼻投与は認知機能を改善しうる
Author(s)	後藤, 秀輔
Description	配架番号 : 2953
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16643号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16643
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98253
Type	doctoral thesis
File Information	GOTOH_Shuhoh.pdf, 全文



学 位 論 文

くも膜下出血に対する幹細胞由来の
エクソソーム経鼻投与は認知機能を改善しうる
(Intranasal administration of stem cell-derived exosome
alleviates cognitive impairment against subarachnoid
hemorrhage)

2 0 2 5 年 9 月

北 海 道 大 学

後 藤 秀 輔

学 位 論 文

くも膜下出血に対する幹細胞由来の
エクソソーム経鼻投与は認知機能を改善しうる
(Intranasal administration of stem cell-derived exosome
alleviates cognitive impairment against subarachnoid
hemorrhage)

2 0 2 5 年 9 月

北 海 道 大 学

後 藤 秀 輔

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	15 頁
考察	24 頁
結論	27 頁
謝辞	28 頁
利益相反	29 頁
引用文献	30 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. Shuho Gotoh, Masahito Kawabori, Sho Yamaguchi, Yo Nakahara, Erika Yoshie, Kohtarou Konno, Yuki Mizuno, Yoichiro Fujioka, Yusuke Ohba, Yuji Kuge, Masahiko Watanabe, Miki Fujimura

Intranasal administration of stem cell-derived exosome alleviates cognitive impairment against subarachnoid hemorrhage
Experimental Neurology, Volume 386・115143, (2025)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shuho Gotoh, Masahito Kawabori, Miki Fujimura
Nasal Administration of Amniotic Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Alleviates Neurological Impairment in a Subarachnoid Hemorrhage(SAH) Animal Model

2024 AANS Annual Scientific Meeting, 2024 年 5 月 3 日～6 日・CHICAGO

2. 後藤 秀輔, 川堀 真人, 池田 琢磨, 中原 葉, 藤村 幹
羊膜間葉系幹細胞由来エクソソームの経鼻的投与はくも膜下出血モデル動物において神経障害を軽減しうる
日本細胞外小胞学会学術集会 (第 10 回), 2023 年 10 月 23 日・24 日・札幌

要旨

【背景と目的】

動脈瘤破裂により発症するくも膜下出血に対しては、動脈瘤の再破裂を予防する開頭クリッピング術や、コイル塞栓術などの治療が確立し、くも膜下出血の合併症である脳血管攣縮の発症予防、もしくは発症時の薬物療法なども確立している。しかし、くも膜下出血による早期脳損傷は、現在有効な治療法がなく、機能的転帰の改善が数十年にわたって改善していない。くも膜下出血の機能的改善をするためには、くも膜下出血後におきる神経炎症を抑制することが新たな治療目標として期待される。

近年の研究では、間葉系幹細胞から放出されるエクソソームが、神経疾患における神経細胞のアポトーシスと神経炎症を効果的に抑制する治療効果が示唆されている。そのため、くも膜下出血後におきる神経炎症を抑制する治療としてエクソソームの投与が有望である。エクソソームの投与法に関しては一般に静脈内投与が選択されることが多いが、静脈内投与に伴う全身希釈の課題から、経鼻投与が新たなアプローチとして有力な選択肢ではないかと考えた。本研究では、くも膜下出血動物モデルにおいて、経鼻投与した間葉系幹細胞由来のエクソソームの効果を研究し、その作用機序を研究した。

また径が 100nm 程度のエクソソームでは PKH26 などによる染色物質で標識を行うことが一般的であった。これらの標識では生体内での移行を確認することができず、また脳部位全体での定量評価が難しかった。そこで経鼻投与されたエクソソームの生体内分布と脳部位ごとのエクソソームの分布を調べるために、本研究ではエクソソームを 64 Cu による標識を行い、経鼻投与されたエクソソームの動態を PET/CT イメージングおよびオートラジオグラフィーで追跡した。

【対象と方法】

羊膜由来間葉系幹細胞の細胞上清を超遠心分離にてエクソソームを単離した。8 週齢の Sprague-Dawley ラットで自己血視交叉前槽注入によりくも膜下出血モデルラット作成した。このくも膜下出血モデルラットに、200 μ L の PBS に溶解した合計 1.2×10^{10} 個のエクソソーム粒子を、受傷直後および 24 時間後に鼻腔内投与した群をエクソソーム投与群とした。比較として、くも膜下出血モデルラットに同量の PBS を投与した群を PBS 投与群とした。両群において受傷後 7 日まで神経機能の評価し、抗アポトーシス効果および抗炎症効果の評価するため、NeuN 染色、Nissl 染色、TUNEL 染色、および Iba 1 染色による免疫組織学的評価を行った。またホモジナイズした脳抽出物中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。くも膜下出血ラットの血液脳関門の破綻と、エクソソームの経鼻投与による血液脳関門破綻の抑制効果を調べるために、エヴァンスブルー染色と脳水分量の測定を行った。

エクソソームの抗炎症効果を *In vivo* で評価するため、初代グリア細胞および初代ミクログリア細胞、BV2 ミクログリア細胞株を用いて、LPS 刺激に対するエクソソームの炎症抑制効果の *in vitro* 解析を実施した。

また経鼻投与したエクソソームの頭蓋内分布を調べるために PKH26 標識エクソソームを使用し頭蓋内の分布も評価した。エクソソームの生体内分布を ^{64}Cu 標識エクソソームの PET/CT イメージングを行い評価し、脳部位の分布を定量化するためにオートラジオグラフィーを用いて評価した。

【結果】

エクソソーム投与群は、PBS 投与群と比較して、多動性が著しく改善した。エクソソーム投与群では、海馬 CA1 領域および大脳皮質においてアポトーシス細胞が減少し、神経細胞の生存率が上昇した。またエクソソーム投与群で特に海馬 CA1 領域の神経炎症が抑制された。くも膜下出血ラットの脳組織ホモジェネート中の IL-6 濃度を ELISA で測定したところ、エクソソーム投与群では PBS 群と比較して有意に減少していた。エクソソーム投与群では PBS 投与群と比べ、エヴァンスブルーの漏出が少なく脳水分量も少ないことから、エクソソームの経鼻投与により血液脳関門の破綻が抑制されていることが示唆された。これらの結果はエクソソームの経鼻投与がくも膜下出血後の神経炎症を抑制し、神経アポトーシスを抑制するという機序を支持するものであった。

また *In vitro* 解析では LPS 刺激に対する初代グリア細胞の生存率と炎症反応をエクソソームが抑制し、初代ミクログリア細胞および BV2 ミクログリア細胞の炎症反応もエクソソーム投与で抑制された。これらの結果はエクソソームの強力な炎症抑制効果を示すものであった。

PET/CT イメージングおよびオートラジオグラフィーにより、エクソソームは経鼻投与 3 時間で嗅球に移行されることが確認され、主に嗅球と大脳に移行していることが明らかになった。さらに、三叉神経と脳幹にもエクソソームが観察された。PKH26 標識エクソソームはミクログリアおよび血管内皮細胞と共局在していた。これらの結果から嗅球、三叉神経周囲の血管にエクソソームが分布し頭蓋内へ移行するのではないかと考えられる結果であった。

【考察】

本研究では、間葉系幹細胞由来のエクソソームを経鼻投与することで神経炎症が抑制され、くも膜下出血後の海馬 CA1 領域や皮質の細胞死が抑制されることを示した。過去の研究と同じくエクソソームの強力な神経炎症抑制作用がその機序になることが示唆された。エクソソームの経鼻投与は静脈内投与と比較して脳内で有意に多く存在することが明らかになっており、脳への薬物送達の有望な経路としてますます認識されている。くも膜下出血以外の神経疾患に対する間葉系幹細胞由来のエクソソーム経鼻投与に関する研究は存在したが、くも

膜下出血に対するエクソソームの経鼻投与が神経機能の改善や神経炎症の抑制を示すことを示したのは、本研究が初めての報告である。

経鼻投与されたエクソソームが頭蓋内に分布する経路は、嗅覚感覚ニューロンまたは三叉神経ニューロンへのエンドサイトーシスを介する細胞内経路と、血管周囲輸送システムを介する細胞外経路という2つの異なる経路が関与することが報告されている。嗅神経と大脳の血管内皮細胞内に標識されたエクソソームが大量に存在し、この細胞外経路による輸送が示唆される。金ナノ粒子などの手法で頭蓋内のエクソソーム移行を示した研究は存在したが、PET/CT やオートラジオグラフィーを使用して定量的および脳神経を含めてエクソソームの分布を示した研究は本研究がはじめてである。今回の研究により、核標識したエクソソームの PET/CT やオートラジオグラフィーにより *In vivo* や *Ex vivo* でエクソソームの分布が定量的・経時的および詳細に観察できることが示唆され、今後のエクソソーム研究への応用が期待される。

【結論】

間葉系幹細胞由来のエクソソームの経鼻投与がくも膜下出血による神経炎症の抑制を介して海馬 CA1 領域の神経アポトーシスを抑制することが示唆され、くも膜下出血における認知機能障害を改善しうることが示唆された。経鼻投与されたエクソソームは嗅神経や三叉神経および周囲の血管を介し、頭蓋内の血管内皮やミクログリアにとりこまれ、脳全体に移行し、神経炎症を抑制されることが示唆された。核標識したエクソソームの PET/CT やオートラジオグラフィーによりエクソソームの分布が定量的・経時的および詳細に観察されうることが示唆された。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CCK-8	Cell Counting Kit-8
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
Iba-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM 1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
mRNA	messenger RNA
PBS	Phosphate-buffered saline
PET/CT	Positron Emission Tomography/ Computed Tomography
RNA	Ribonucleic acid
TNF- α	tumor necrosis factor- α

緒言

動脈瘤破裂によって引き起こされるくも膜下出血は、年間1万人に1人が罹患する重大な疾患である(Feigin et al., 2009)。早期に外科的介入を行い、術後に集中管理を行ったとしても、くも膜下出血患者の死亡率は35%と依然高いままである(Neifert et al., 2021)。さらに、くも膜下出血生存者のおよそ3分の1の患者は、記憶障害や気分障害などの認知機能障害を経験し、日常生活に大きな影響を及ぼす(Taufique et al., 2016)。医療の進歩にもかかわらず、くも膜下出血患者の予後は数十年にわたって改善されておらず、革新的な治療法の開発が緊急に必要であることが浮き彫りになっている。動脈瘤破裂直後に起こる一次性脳損傷は完全には回避することは困難と考えられるが、くも膜下出血後数日以内に発症する微小循環障害、血液脳関門の崩壊、神経炎症、脳浮腫、酸化カスケード、神経細胞のアポトーシスからなる二次性脳損傷（早期脳損傷とも呼ばれる）は、有望な治療目標として大きな注目を集めている(Lauzier et al., 2023)。間葉系幹細胞は、神経疾患の薬剤候補として広く研究されており、現在多くの臨床試験が進行中である(Kawabori et al., 2020) (Kawabori et al., 2024)。間葉系幹細胞の高い免疫調節効果と神経分化能力は非常に有望ではあるが、凍結保存は幹細胞の死と損傷を引き起こし、有効性を減らし、臨床使用を妨げる可能性がある(Marquez-Curtis and Elliott, 2024)。最近の研究により、間葉系幹細胞由来のエクソソームは間葉系幹細胞の重要な治療メカニズムである可能性があることが明らかになり、有望な代替候補と考えられている(Mathieu et al., 2019) (Tkach and Thery, 2016) (Valadi et al., 2007)。40~200 nm のナノサイズの小胞であるエクソソームは幹細胞から放出され、培養液の上清から採取することができる。培養液の上清は一定期間、損傷を受けずに保存できる。エクソソームはDNA、mRNA、マイクロRNA、タンパク質など、無数の分子を内包しており(Kosaka et al., 2010)、これらの分子を標的細胞に導入することで、神経疾患の治療効果をもたらす(Mathieu et al., 2019) (Tkach and Thery, 2016) (Valadi et al., 2007)。エクソソームの非常に高い抗炎症効果に関しては、これまで当教室の研究でも示唆されており(Morishima et al., 2024) (Ikeda et al., 2024)、脳全体に神経炎症が及ぶくも膜下出血では、エクソソームの治療効果が強く期待できるのではないかと考えた。実際、静脈内投与された間葉系幹細胞由来のエクソソームは、抗アポトーシスおよび抗炎症効果を通じて、くも膜下出血による神経学的損傷を改善すると報告されている(Lai et al., 2020) (Liu et al., 2021) (Xiong et al., 2020) (Zhao et al., 2019)。

エクソソームの治療効果を最大限に高めるには、十分な量のエクソソームを脳に送達することが極めて重要である。投与時の塞栓性合併症が危惧される動脈内投与や出血性合併症が危惧される脳室内投与に比べて、静脈内投与は侵襲性が低いと考えられているが、投与されたエクソソームが肝臓、肺、脾臓などの

臓器に取り込まれ、脳へのエクソソームの蓄積量は 0.00～0.01 % と非常に少ないことが報告されている(Choi et al., 2022)。そのような状況で、鼻腔内投与は、エクソソームを脳に送達する簡便かつ効率的な方法であるため、臨床応用にむけて非常に有望な治療法になりうると考えた。エクソソームは嗅神経や三叉神経の細胞内もしくは細胞外経路を通して脳に移行し、神経疾患を軽減することが報告されている(Dhuria et al., 2010)。しかし、このアプローチの有効性はくも膜下出血モデルでは評価されていない。そこで、間葉系幹細胞由来エクソソームの鼻腔内投与がくも膜下出血に続く神経機能障害を改善できるかどうかを研究し、その基礎となる機序を解明することを試みた。

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動物実験倫理委員会の承認を得た（承認番号：17-0065）。すべての実験手順は、「動物実験に関する施設ガイドライン」、日本学術会議の「動物実験の適正な実施に関するガイドライン」および「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した。

間葉系幹細胞由来エクソソームの分離について

Kaneka Corporation（大阪府、日本）から提供されたヒト羊膜由来間葉系幹細胞のバイアルを解凍し、 2.0×10^5 細胞/mL の濃度で培地中に播種し、5 日間培養した。その後、培地を血清不含細胞培養培地（MEM α 、12561056、ThermoFisher）に置き換え、2 日間培養してエクソソーム含有培地上清を得た。エクソソームの分離には、以前に報告された方法に従い、超遠心分離法を採用した(Ikeda et al., 2024)。エクソソームの分離に関しては当教室で研究実績があり当研究での先行研究を要しなかった。まず、上清を $2,000 \times g$ で 10 分間、次いで $10,000 \times g$ で 30 分間の連続遠心分離を行い、死細胞と細胞残渣を除去した。その後、上清を $100,000 \times g$ で 70 分間超遠心分離し、エクソソームに対応する小さな小胞からなる沈殿物を形成した。分離し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、Hitachi、日本）およびナノ粒子追跡分析（Videodrop、Myriade、フランス）により確認した。さらに、ウェスタンブロッティングを用いて、得られたエクソソームの表面マーカーを同定した。 6.3×10^9 個のエクソソームが含まれた $420 \mu\text{l}$ のエクソソーム抽出液を氷冷した $500 \mu\text{l}$ の RIPA 混合液に溶解し、 4°C で 10 分間、 $12,000 g$ で遠心分離・上清回収を 2 回行った。BCA Protein Assay Kit（Thermo、米国）にてタンパク質含有量を定量した。タンパク質サンプル（ $15 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ ）に NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)（Thermo、米国）を $5 \mu\text{l}$ 加え、 70°C 10 分加熱した。NuPAGE® Bis-Tris Precast Gel（Thermo、米国）を使用し 200V 定電圧で約 35 分電気泳動した。2%ECL Prime blocking agent にて Blocking した後、一次抗体を加えて 4°C で一晩インキュベーションした。一次抗体は抗 CD9 マウスモノクローナル抗体 (1:500、014-27763、富士フイルム和光、日本)、抗 CD63 マウスモノクローナル抗体(1:500、012-27063、富士フイルム和光、日本) 抗カルネキシン抗体(1:500、ab22595、Abcam、米国)を使用した。抗 CD9 マウスモノクローナル抗体、抗 CD63 マウスモノクローナル抗体に対する二次抗体は抗マウス IgG 抗体(NA931-100UL、Cytiva、米国)を使用した。抗カルネキシン抗体に対する二次抗体は抗ウサギ IgG 次抗体 (NA934-100UL、Cytiva、米国)を使用した。二次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした後、Clarity Wester ECL Substrate（BIO RAD、米国）を使用してシグナルを検出し、ChemiDoc Touch イメージングシステム（BIO RAD、米国）で取得した。

くも膜下出血モデルと経鼻エクソソーム投与について

生後 8 週齢、体重 290~320 g の雄の Sprague-Dawley ラット (CLEA Japan, Inc. 日本) を用いて、以前に報告された方法に若干の改変を加えてくも膜下出血実験モデルを作成した (Prunell et al., 2002)。改変に関しては自己血を逆流なく行う工夫など要したもので、特に先行研究にあたるものなどはなかった。ラットの体重を測定し、イソフルランガス麻酔を施した後、定位フレーム内で腹臥位にした。頭皮の正中切開後、ブレグマの前方 7.5 mm、正中線から右 1 mm の位置に 1 mm の穿頭孔をあけた。大腿静脈から新鮮に採取した自己血 (500 μ L) を、矢状面で 30° 傾斜させた 27 ゲージ点眼針 (Nipro, 日本) を用いて、視交叉前槽に 1 分かけて注入した。ラットはランダムにエクソソーム投与群と PBS 投与群の 2 群に分けられ、それぞれ 200 μ L の PBS、または 200 μ L の PBS に溶解した 1.2×10^{10} 個のエクソソームを投与した。エクソソームは以前に報告された方法に従って経鼻投与された (Thomi et al., 2019, Ikeda et al., 2024)。全身麻酔後、ヒアルロニダーゼ (各鼻孔に 100 U/5 μ L) で 30 分間鼻腔内洗浄した後、200 μ L ピペットチップを装着したマイクロピペットを用いて、各鼻孔に 100 μ L のエクソソーム溶液または PBS を経鼻投与した。エクソソームが嗅神経に吸収されやすくするため、動物は 30 分以上仰臥位にした。エクソソームは、くも膜下直後 (0 日目) と翌日 (1 日目) の 2 回、同様の手法・用量を用いて投与した。

神経機能検査について

当初 Water maze 試験による神経機能評価を予定していたが、くも膜下出血モデルラットで水泳不能になるラットが存在することなどから予備試験の段階で Water maze 試験を中止した。

正常なラットは環境に適応し、探索行動を減らす、脳に損傷のあるラットは不安の欠如と空間認知・記憶障害のために探索行動が増加することを利用し、認知機能のモニタリングには、以前に報告されたものに若干の修正を加えたオープンフィールドテストを採用した (Blednov et al., 2002) (Smolensky et al., 2019) (Sukhanova et al., 2019)。若干の修正に関しては当教室にある設備にある設備を使用したことによるものである。ラットを円形アリーナの中央に 3 分間置いた。アリーナは灰色で、直径 147 cm、壁の高さは 45 cm であった (室町機械株式会社、東京、日本)。テストは、くも膜下出血後 1 日目、3 日目、7 日目に 1 日 3 回繰り返した。アリーナでの行動はビデオ録画し、Smart 3.0 コンピューター化ビデオ追跡システム (Panlab、スペイン) を使用して評価した。中央ゾーンは、アリーナの周囲の 15 cm 近位に位置する円形領域として区切られた。アリーナ内を移動した総距離、中央ゾーンに入った回数、および中央ゾーンでの休憩時間を計算した。

組織学的分析について

ラットを深く麻酔し、以前に報告された方法に従い、PBS による経心腔灌流 followed by 4%パラホルムアルデヒド (PFA) による灌流行ったのち断頭した。脳は摘出後、4% PFA で 24 時間固定し、パラフィン包埋後、クライオスタットミクロトーム (LEICA RM2125 RTS、Leica Biosystems、ドイツ) を使用して 4 μ m の厚さの冠状切片に切断した(Kawabori et al., 2012) (Kawabori et al., 2015)。続いて、NeuN 染色、Nissl 染色、TUNEL 染色、および Iba 1 染色を実施して、それぞれ海馬および皮質におけるニューロン生存、ニューロンアポトーシス、および神経炎症を評価した(Ikeda et al., 2024) (Takamiya et al., 2022b)。海馬 CA1 領域内や皮質の陽性シグナルの数または陽性細胞が占める領域の割合は、自動細胞/領域カウンター (BZ-X Analyzer、Keyence Co., 大阪、日本) を使用して測定した。臨床症状の問題となるくも膜下出血の後遺症である記憶障害において強く関心をむけるべき領域であると考察したことにより、今回の研究では海馬 CA1 領域を評価した。また一般的にくも膜下出血の動物モデルで評価される皮質に関しても評価することとした。

Ex-vivo 分析について

くも膜下出血後の血液脳関門の透過性への影響および、血液脳関門の透過性に対する間葉系幹細胞由来のエクソソームの効果を評価するために、エヴァンスブルー染色を行った(Wang et al., 2020)。くも膜下出血 3 日後に、2% のエヴァンスブルー色素 (5ml/kg、富士フイルム和光、東京) を左大腿静脈に注入した。本研究にあたり、エヴァンスブルーを全量大腿静脈に注入するために手技の徹底を行うため、手技の練習が必要であったが先行研究は必要なかった。注入 24 時間後に脳を採取した。右前頭葉の針跡が結果に影響を与える可能性があるため、嗅神経から 0~7mm の左前頭葉をその後の分析用に採取した。サンプルを 50% トリクロロ酢酸溶液で均質化し、15000G で 30 分間遠心分離した。上清をエタノールに加え、体積比 1:3 に希釈した。24 時間インキュベートした後、エヴァンスブルーの吸光度を 620 nm で測定した。結果は、脳組織 1 グラムあたりのエヴァンスブルー染料の光学密度として定量化した。また同様にくも膜下出血後の血液脳関門の透過性への影響および、血液脳関門の透過性に対する間葉系幹細胞由来のエクソソームの効果を評価するために、脳水分量も評価することとした(Shen et al., 2020)。くも膜下出血の 3 日後に脳を素早く摘出し、大腦を小脳と脳幹から分離した。摘出した直後に大腦の重量を直ちに測定し、その後 100°C で 24 時間乾燥させた後に乾燥重量を得た。脳水分量は $[(\text{摘出直後の脳重量} - \text{乾燥脳重量}) / \text{摘出直後の脳重量}] \times 100 \%$ の式で計算した。

脳炎症は、ELISA を用いて、ホモジナイズした脳抽出物中の IL-6 濃度を定量す

ることによって評価した。この方法は、以前の報告に若干の改変を加えたものであった(Arakawa et al., 2023) (Takamiya et al., 2022a)。脳はくも膜下出血発症 3 日後に摘出され、脳組織抽出物中の IL-6 濃度は、Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いて測定した。

抗神経炎症効果の *in vitro* 評価

くも膜下出血のエクソソームの抗神経炎症効果を研究するためにマウスの初代混合グリア細胞を採取し LPS 刺激に対するエクソソームの神経炎症抑制効果について研究することとした。マウスを利用したことは、文献狩猟するにあたりラットよりマウスが手法確立していることと、ラットの新生児が入手困難であったことによる。

マウスの初代混合グリア細胞（豊富なアストロサイトを含む）および一次ミクログリア細胞を、以前に報告された方法に従って収集した(Ishibashi et al., 2024) (Karino et al., 2023) (Tsuboi and Gotoh, 2021)。混合グリア細胞の取得には、安楽死させた新生児 BALB/cCrSlc マウス (P1-3、雄雌) を使用した。新皮質組織は、酵素溶液、分散溶液、分離溶液から構成される Neuron Dissociation Solutions (富士フイルム和光、日本) で細胞分離を行った。組織に 2.5 mL の酵素溶液を加え、37°C で 30 分間培養した。分散溶液を室温で 150 × g で 4 分間遠心分離し、得られた上清を除去した。沈殿物に分散溶液 2.5 mL を加え、マイクロピペットを使用して優しく攪拌した。細胞懸濁液の下層に分離溶液 2.5 mL を加え、室温で 160 × g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。回収した細胞を、B-27 (最終 B-27 濃度 2%) と GlutaMAX™ I Supplement (最終濃度 0.5 mM) を添加した Neurobasal™ Plus Medium (ThermoFisher Scientific, MA, USA) に再懸濁し、ポリエチレンイミンでコーティングされた 24 ウェル培養プレート (1×10⁶細胞/ウェル) に播種した。翌日に培地を交換して死細胞を除去し、最終濃度が 5 μM になるように Ara-C を追加した。培地は 2~3 日ごとに交換し、培養は 14 日間継続した。

初代混合グリア細胞を 1×10⁶個/ウェルの密度で 24 ウェルプレートに播種し、100 ng/mL の LPS およびエクソソーム (9.2×10⁸ 個) または生理食塩水を添加して 24 時間培養した。LPS 刺激を受けた混合グリア細胞の生存率を分析するため、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) アッセイ (Dojindo、熊本、日本) を製造元のプロトコルに従って実施した。同様に、エクソソームの抗炎症効果を調べるため、PBS またはエクソソームを LP 投与後の細胞に添加し、ELISA により IL-6 と TNF-α の濃度を測定した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Multiskan SkyHigh ; ThermoFisher Scientific、MA、米国) を用いて 450 nm の波長で測定した。

また *In vivo* でくも膜下出血ラットにて、間葉系幹細胞エクソソームの経鼻投与により特に海馬 CA 1 領域周囲のミクログリアの増生が抑制されたことから、

In vitro での再現を試み、エクソソームの神経炎症抑制効果について研究することとした。初代混合グリア細胞を採取と同様に文献で方法が確立しているマウスを用いた(Karino et al., 2023)。ミクログリアは、生後 3 日以内の BALB/c CrSlc マウスから分離した。7 日齢以内の BALB/c CrSlc マウスを断頭し、脳を氷冷ハンス平衡塩溶液に浸した。脳は Neural Tissue Dissociation Kit (P) (Miltenyi Biotec) を使用して酵素的に消化した。0.2 mM EDTA と 2% FBS を含む PBS で再懸濁後、MACS システム (Miltenyi Biotec) を使用して CD11b 発現を陽性選択した。ミクログリアを 3 日間培養し、96 ウェルプレートに 5×10^4 細胞/ウェル密度で播種し、100 ng/ml LPS および/またはエクソソーム (4.6×10^8 粒子) を 24 時間添加した。細胞培養液を回収し、ELISA (M6000B-1、MTA00B、R&D Systems, Inc) を用いて IL-6 および TNF- α の濃度を測定し、刺激に対する神経炎症反応を評価した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Multiskan SkyHigh; ThermoFisher Scientific, MA, USA) を用いて 450 nm の波長で測定した。

また上記の研究に関しては工程が複雑であることから再現性も考慮し、入手が比較的容易な BV2 ミクログリア細胞による同様の研究も行った。BV2 ミクログリア細胞を 96 ウェルプレートに 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、100 ng/mL LPS で刺激し、同時にエクソソーム (2.8×10^9 粒子/ウェル) を 24 時間共培養した。その後、初代混合グリア細胞での研究と同様に Cell Counting Kit-8 (CCK-8) アッセイを使用して細胞生存率を評価した。また、細胞培地を採取し、ELISA (M6000B-1、MTA00B、R&D systems, Inc) で IL-6 および TNF- α 濃度を評価し、LPS 刺激に対する神経炎症反応を評価した。

PKH26 標識エクソソーム投与による頭蓋内分布評価について

PKH26 染色 (PKH26GL、Sigma Aldrich、米国) にてエクソソームを標識した。PKH 26 にて標識したエクソソームの頭蓋内分布を、グリオキサール固定を使用した蛍光イメージングにより、鼻腔内投与から 3 時間後の動物で評価した (Konno et al., 2023)。

エクソソームの免疫組織化学は、共焦点顕微鏡と超解像度イメージングを用いて実施された。画像は、Nikon Eclipse Ti2-E 顕微鏡 (ニコン、東京、日本) に、テレダイネ・フォトメトリクス (ツーソン、アリゾナ州、米国) 製の PRIME BSI back-illuminated scientific complementary metal oxide semiconductor カメラ、PlanApo 10 $\times$ /0.45 または 60 $\times$ /1.2 の対物レンズ、TI2-CTRE 顕微鏡コントローラー (ニコン)、TI2-S-SE-E motorized stage (ニコン) を使用して撮影した。細胞は、FF01-391/477/549/639/741 励起フィルター (Semrock、米国ニューヨーク州ロチェスター) を介して、CELESTA ライトエンジン (Lumencor、米国オレゴン州ノースウェスト・グリーンブライアー・パークウェイ・ビーバートン)

で励起した。発光フィルターは、DAPI に対しては FF02-438/24、PKH 標識エクソソームには FF01-595/31 を選択した。イメージング分析全体を通して、FF421/491/567/659/776-Di01 ダイクロイックミラー (Semrock) を使用した。共焦点および超解像画像は、X-Light V3 (CrestOptics、ローマ、イタリア) スピニングディスク共焦点ユニットおよび DeepSIM (CrestOptics) を使用して取得した。顕微鏡および周辺機器は、VisiView (Visitron Systems、プフハイム、ドイツ) を使用して制御した。

PKH26 標識エクソソーム投与群と PBS 投与群の両方において、PKH26 陽性エクソソームに囲まれた核の割合を定量化した。PKH26 標識エクソソームの細胞内取り込みをさらに調べるため、海馬 CA1 領域において抗 ICAM-1 抗体および抗 Iba1 抗体を用いた共免疫組織化学染色を行い、それぞれ内皮細胞およびミクログリア／マクロファージを同定した。

鼻腔内投与後のエクソソームの生体内分布について

鼻腔内に投与されたエクソソームが頭蓋内に移行するかについて検討するために ^{64}Cu -SCN-NOTA にて標識したエクソソームを用いて PET/CT imaging およびオートラジオグラフィーにて評価することとした。

エクソソーム溶液を PD-SpinTrap G-25 カラム (Cytiva、東京、日本) を用いて 0.1 M Na_2CO_3 緩衝液 (pH 10) に置換した。これとは別に、p-SCN-Bn-NOTA (Macrocylics、米国テキサス州プラノ) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、 $^{64}\text{CuCl}_2$ (^{64}Cu 138 MBq、PDRadiopharma Inc.、東京、日本) とともに室温で 20 分間インキュベートして ^{64}Cu -SCN-NOTA を調製した。 ^{64}Cu -SCN-NOTA (12.5 μg) を 0.1 M Na_2CO_3 緩衝液 (pH 10) に溶解したエクソソーム (331.2 μg) とともに、 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、余分な ^{64}Cu -SCN-NOTA とその他の低分子量不純物を除去した。このゲルろ過時に、反応緩衝液を PBS に置き換えた。精製後の ^{64}Cu -NOTA エクソソームの放射化学純度は、薄層クロマトグラフィーで測定し、薄層クロマトグラフィー上の放射活性は、オートラジオグラフィー (Fla-7000、富士フイルム、日本) で定量した。この結果標識エクソソーム (4.8 MBq、エクソソーム 77.8 μg 、200 μL) が得られた。

くも膜下出血翌日、標識エクソソーム (4.8 MBq、エクソソーム 77.8 μg 、200 μL) を経鼻投与した ($n = 1$)。投与後 55~65 分および 175~185 分に PET 画像を取得した。CT 画像は PET スキャン後に取得した。PIInveon preclinical small-animal multimodality PET/CT system (Siemens Medical Solutions、米国テネシー州ノックスビル) を使用して実施し、PET/CT 融合画像は、Inveon 研究職場ソフトウェア v.4.1 (Siemens Medical Solutions、米国テネシー州ノックスビル) を用いて生成された。

続いて、同様の手法により得られた ^{64}Cu -NOTA-エクソソームを使用し、オー

トラジオグラフィーを用いて、鼻腔内投与後に脳に送達されたエクソソームの数を定量化した。くも膜下出血翌日、 ^{64}Cu -NOTA-エクソソーム（1.9 MBq、エクソソーム 15 μg 、100 μL ）を経鼻投与し（ $n = 3$ ）、投与 3 時間後にラットを断頭した。ラットの脳を 2 mm ごとに冠状切片に切断し、視神経、嗅神経、三叉神経も採取した。これらの切片のオートラジオグラムは、phosphor imaging plates（BAS-TR 2025、富士フイルム、東京、日本）および LAS7000（富士フイルム）を用いて取得した。放射能は Multi Gauge V 3.0（富士フイルム）を用いて定量した。

統計解析

すべての評価は盲検化して行った。統計解析は JMP Pro 14 ソフトウェア（SAS Institute Inc.、米国ノースカロライナ州）を用いて実施した。サンプルサイズは、過去の実験における類似実験に基づいて選択した。2 つの異なるグループ間の統計的比較は t 検定または Wilcoxon 検定を用いて行われ、3 つのグループ間の差は 1 要因分散分析（Analysis of Variance）と Tukey's Honestly Significant Difference 検定を用いて検証した。P < 0.05 の確率値が統計的に有意であると判断した。

結果

エクソソームの特性について

透過型電子顕微鏡にてエクソソームが平均直径約 90nm の均一な形状を呈していることが明らかになった (図 1)。

得られたエクソソームはナノ粒子分析装置によるサイズ分布データによって 150nm 程度の径で分布していることがわかった (図 2)。

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 の発現レベルが上昇していることが示された。一方、小胞体マーカー特異的なマーカーであるカルネキシンの発現はほとんどみられなかった (図 3)。これらの結果から、間葉系幹細胞由来の上清した溶液を超遠心分離した今回のサンプル中にエクソソームが確実に存在することがわかった。

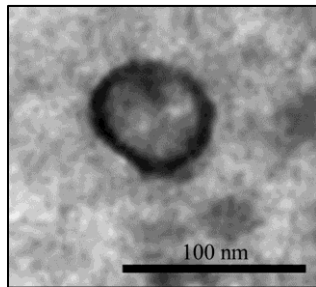


図 1 透過型電子顕微鏡によるエクソソームの観察
直径約 100 nm のエクソソームが観察された

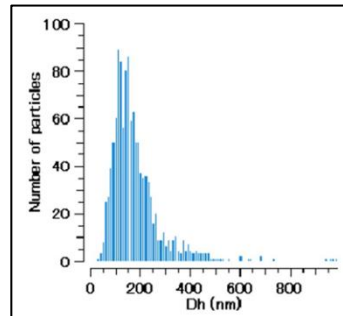


図 2 ナノ粒子分析装置によるサイズ分布
エクソソームの径は 80～300 nm の範囲にあり、ピークは 150 nm であった

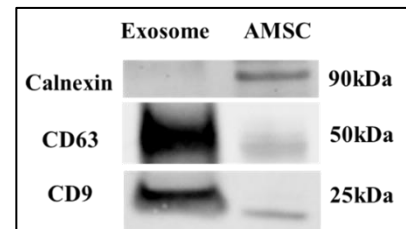


図 3 エクソソームのウェスタンブロット解析
エクソソーム特異的マーカーである CD9 と CD63 発現が上昇していた

神経機能評価について

合計 106 匹のラットを *in vivo* 評価に使用した。エクソソーム投与群と PBS 投与群の死亡率は、それぞれ 21% と 21% で同等であった。すべてのラットはくも膜下出血誘発の翌日までに死亡した。

PBS 投与群は、総移動距離 (図 4)、中心領域に入る頻度 (図 5)、および 7 日目に中心領域で滞在した時間の割合 (図 6) の顕著な増加を示した (* $p < 0.05$)。これは探索行動の増加を示し、その原因として不安の欠如と空間認知・記憶障害が起きたことを示唆すると考察した。対照的に、エクソソーム投与群は、7 日目に探索行動の増加が有意に抑制された。

これらの知見は、エクソソーム治療が、不安の欠如と空間認知・記憶障害に関連する多動行動を軽減することを示唆していると考えられる。

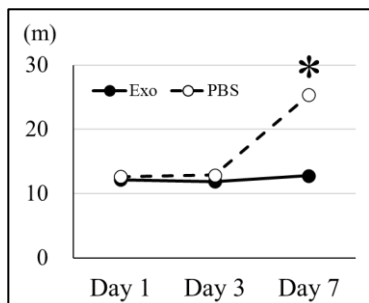


図4 オープンフィールドテストの総移動距離 (m) PBS 投与群は Day7 に顕著な増加を示し、エクソソーム投与群では増加が抑えられた

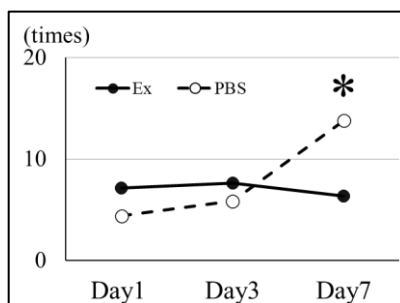


図5 オープンフィールドテストの中心に入る回数 (回) PBS 投与群は Day7 に顕著な増加を示し、エクソソーム投与群では増加が抑えられた

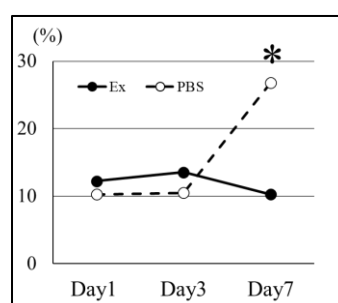


図6 中心領域で過ごした時間の割合 (%) PBS 投与群は Day7 に顕著な増加を示しエクソソーム投与群では増加が抑えられた

ニューロン細胞のアポトーシスと生存ニューロンについて

くも膜下出血により不安の欠如と空間認知・記憶障害を呈し、またエクソソーム投与により改善したことが示唆された *in vivo* のオープンフィールドテストの結果を受けて、くも膜下出血で注目すべき海馬 CA1 領域と、脳皮質の組織学的解析とを行った。

海馬 CA1 領域では TUNEL 染色で観察されたアポトーシス細胞数は PBS 投与群で豊富にみられたのに対し、エクソソーム投与群では有意に減少していた (図 7)。またアポトーシスを反映して、NeuN 染色で観察された生存神経細胞数は、エクソソーム投与群では PBS 投与群と比較して有意に維持されていた (図 8)。

さらに、皮質損傷を評価するために、Nissl 染色を用いて皮質神経細胞数を定量した。エクソソーム投与群では、PBS 投与群と比較して皮質細胞数の減少が有意に抑制されていた (図 9)。

図 7~9 において図中の Bar=20 μ m、

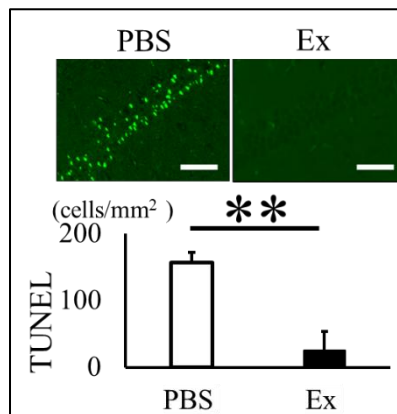


図7 TUNEL 染色(海馬) PBS 投与群と比較して、海馬 CA1 領域のアポトーシス細胞数は、エクソソーム投与群では有意に減少していた

図中の**は $p < 0.01$ を示している。

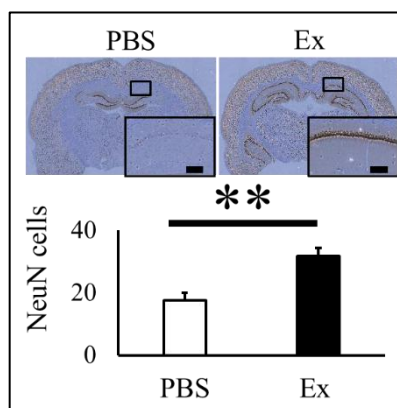


図8 NeuN 染色(海馬)

PBS 投与群と比較して、CA1 領域の生存ニューロンは、エクソソーム投与群で有意に維持されていた

海馬 CA1 領域の生存ニューロンは、エクソソーム群で有意に維持されていた

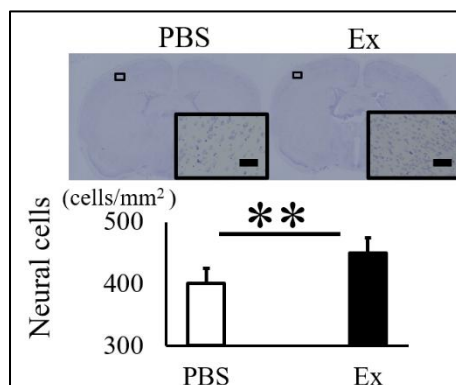


図9 Nissl 染色(皮質)

PBS 投与群と比較して、皮質ニューロン細胞は、エクソソーム投与群で有意に維持されていた

ミクログリア活性について

くも膜下出血後のアポトーシスに関して神経炎症の関連性を明らかにするために、Iba-1 染色によるミクログリアの評価および ELSIA による IL-6 濃度の測定を行った。その結果、Iba-1 染色により活性化ミクログリア/マクロファージが示され、活性化ミクログリア/マクロファージもエクソソーム群で有意に減少していることが明らかになった (図 10)

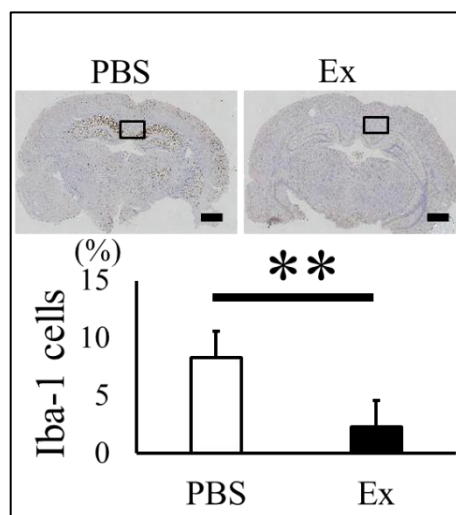


図10 Iba-1 染色

PBS 投与群と比較して、活性化ミクログリア/マクロファージがエクソソーム投与群で有意に減少していた

また、くも膜下出血ラットの脳組織ホモジェネート中の IL-6 濃度を ELISA で測定したところ、エクソソーム投与群では PBS 投与群と比較して有意に減少しており、エクソソーム投与が脳の神経炎症を減弱させることが示唆された（図 11）。

図 10 において図中の Bar=20 μ m、** p < 0.01 を示している。

図 11 において*は p < 0.05 を示している。

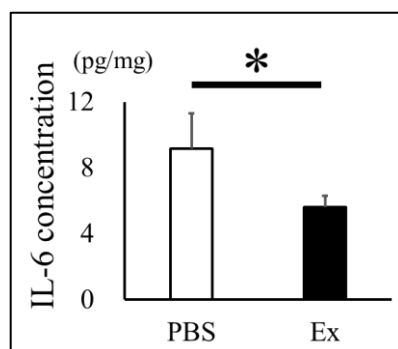


図 11 ELISA による IL-6 濃度測定
PBS 投与群と比較して、エクソソーム投与群で IL-6 濃度が有意に減少していた

血液脳関門の評価について

くも膜下出血ラットに対するエクソソームの経鼻投与が神経炎症を抑制していることが示唆されたため、血液脳関門の破綻について抑制をしているかも評価することとした。脳水分量分析では、エクソソーム投与群では PBS 投与群と比較して有意に減少しており、エクソソーム処理がくも膜下出血後の血液脳関門破綻を抑制させたことが示唆された（図 12）。

さらに、くも膜下出血モデルにおいて、エクソソーム投与群では PBS 投与群と比較してエヴァンスブルーの血管外漏出が有意に減少しており、血液脳関門破綻が抑制されたことが示唆された（図 13）。

図 12、13 の**は p < 0.01 を示している。

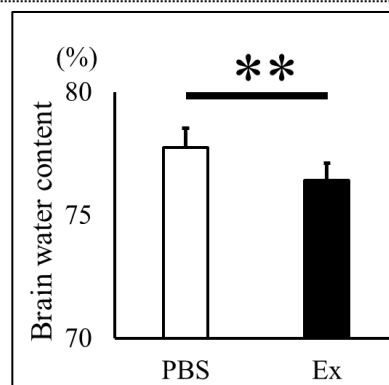


図 12 脳水分量分析
PBS 投与群と比較して、エクソソーム投与群で脳水分量が有意に減少していた

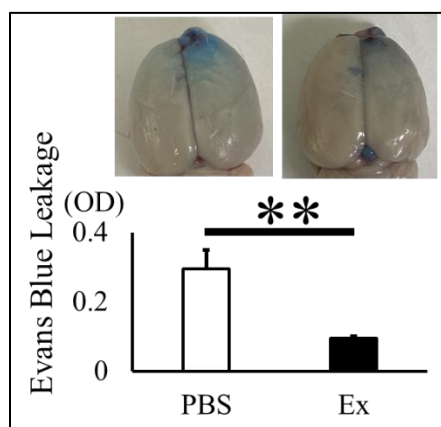


図 13 エヴァンスブルー分析
PBS 投与群と比較して、エクソソーム投与群でエヴァンスブルーの血管外漏出が有意に減少していた

間葉系幹細胞由来エクソソームの抗炎症効果の In vitro 研究について

エクソソームの神経炎症抑制効果を調べるために、PBS もしくはエクソソームを、LPS 刺激した培養細胞に投与しインキュベートする研究を行った。周産期マウスの脳から得られたアストロサイトを豊富に含む初代混合グリア細胞、周産期マウスの脳から得られた初代ミクログリア細胞、およびミクログリア細胞株 BV-2 細胞の 3 つの異なる細胞により同様の実験系を行った。

混合グリア細胞培養では、LPS 刺激により TNF- α および IL-6 の産生がともにアップレギュレーションされ、エクソソーム投与により著しく減少した。

CCK-8 により、エクソソーム投与により LPS 投与後の混合グリア細胞の生存率が逆転したことが示された (図 14)。LPS 刺激による TNF- α および IL-6 の産生とエクソソーム投与による TNF- α および IL-6 産生抑制効果は、初代ミクログリア細胞 (図 15) およびミクログリア細胞株 BV2 細胞 (図 16) においても観察された。図 14-16 の ** は $p < 0.01$ を示している。

これらの結果は、間葉系幹細胞由来のエクソソームの強力な抗炎症効果を示している。

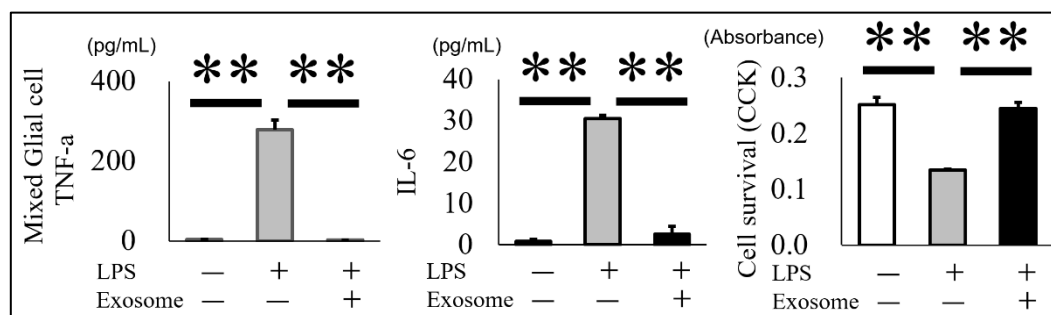


図 14 LPS 刺激を受けた初代混合グリア細胞への LPS 投与とエクソソーム投与後の、ELISA (TNF- α , IL-6) および CCK-8 による評価
LPS 刺激により TNF- α および IL-6 の産生が上昇し、エクソソーム投与により有意に減少した
また、エクソソーム投与は LPS 投与後の混合グリア細胞の生存率を回復させたことが明らかになった

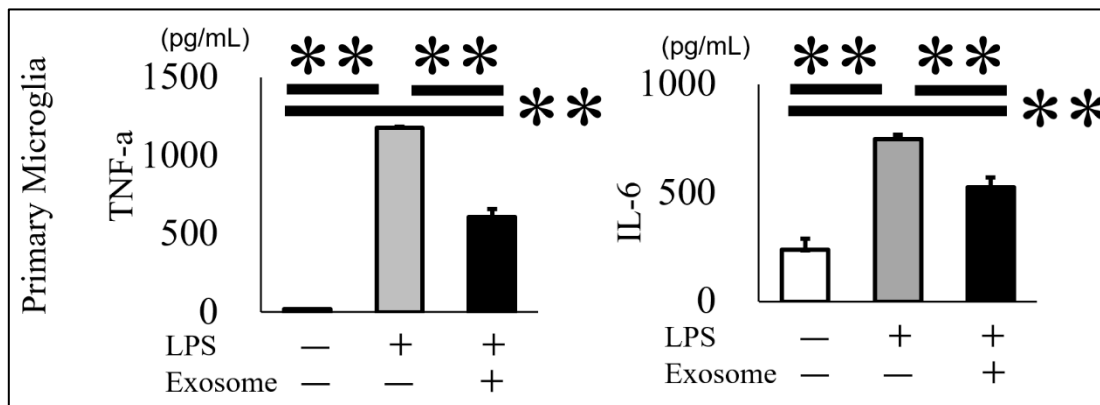


図 15 LPS 刺激を受けた初代ミクログリア細胞への LPS 投与とエクソソーム投与後の、ELISA (TNF- α , IL-6) による評価
LPS 刺激により TNF- α および IL-6 の産生が上昇し、エクソソーム投与により有意に減少した

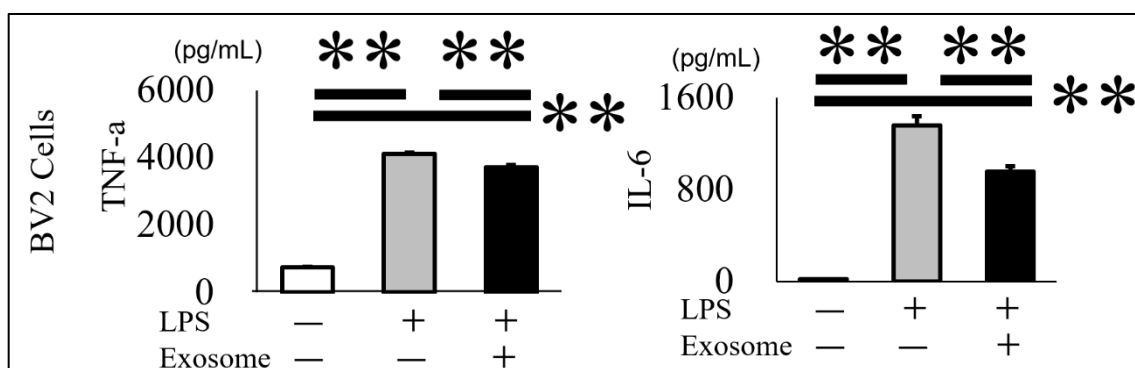


図 16 LPS 刺激を受けた BV2 ミクログリア細胞への LPS 投与とエクソソーム投与後の、ELISA (TNF- α , IL-6) による評価
LPS 刺激により TNF- α および IL-6 の産生が上昇し、エクソソーム投与により有意に減少した

経鼻投与されたエクソソームの生体内分布について

エクソソームの経鼻投与によりくも膜下出血の神経炎症が抑制されることが示唆されたため、エクソソームが確実に頭蓋内に分布していることを可視化することを試みるために PET/CT による研究を行った。

PET/CT により、 ^{64}Cu -SCN-NOTA で標識されたエクソソームは投与後 1 時間で主に鼻腔で観察されたことが明らかになった (図 17)。エクソソームは投与後 3 時間で鼻腔と嗅球に観察された (図 17 矢印)。しかし、 ^{64}Cu で標識されたエクソソームはエクソソームを含む液体が飲み込まれた食道でも観察された (図 17 矢頭)。

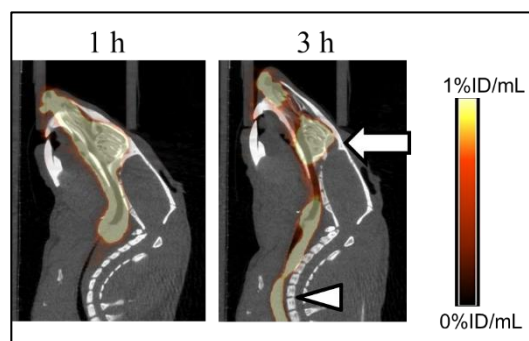


図 17 PET/CT

^{64}Cu で標識されたエクソソームは投与後 1 時間で主に鼻腔に観察され、投与後 3 時間では鼻腔と嗅球に観察された (矢印) 食道でも、一定量の ^{64}Cu で標識されたエクソソームが観察された (矢頭)

頭蓋内のエクソソームの分布の詳細を調べるために、経鼻投与後 3 時間の ^{64}Cu -NOTA-エクソソームの ex vivo オートラジオグラフィーを別途実施した (図 18)。最も高い放射能は嗅球で認められ、約 1×10^5 個のエクソソーム粒子が観察された (図 19)。特に損傷側の

大脳でもエクソソームの蓄積が高かった。一方、視神経への放射能の蓄積はほとんど見られなかった。興味深いことに、三叉神経と脳幹にも放射能が観察されており、これは経鼻投与における代替吸収経路となる可能性があることが示唆された。

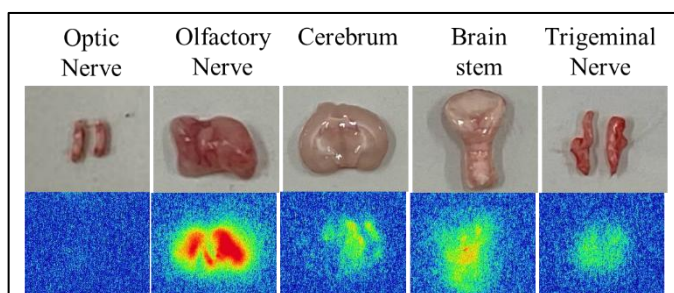


図 18 オートラジオグラフィーの定性画像

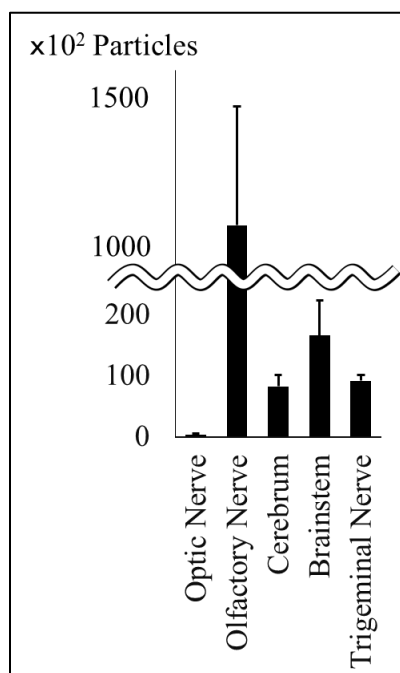


図 19 オートラジオグラフィーによるエクソソーム分布の定量化結果

64 Cu で標識されたエクソソームは投与後 3 時間で嗅球に多く観察された
 大脳にも蓄積がみられ、脳幹や三叉神経にも観察された

また、PKH26 染色を用いてエクソソームの脳内分布も解析した。定量分析の結果、嗅神経内に PKH-26 陽性細胞が有意に存在することが明らかになり、嗅神経細胞の約 7.3% が PKH-26 の取り込みを示した (図 20)。図 20 の ** は $p < 0.01$ を示している。

PKH26 標識エクソソームは、血管内皮細胞およびミクログリア内に同定された (図 21)。

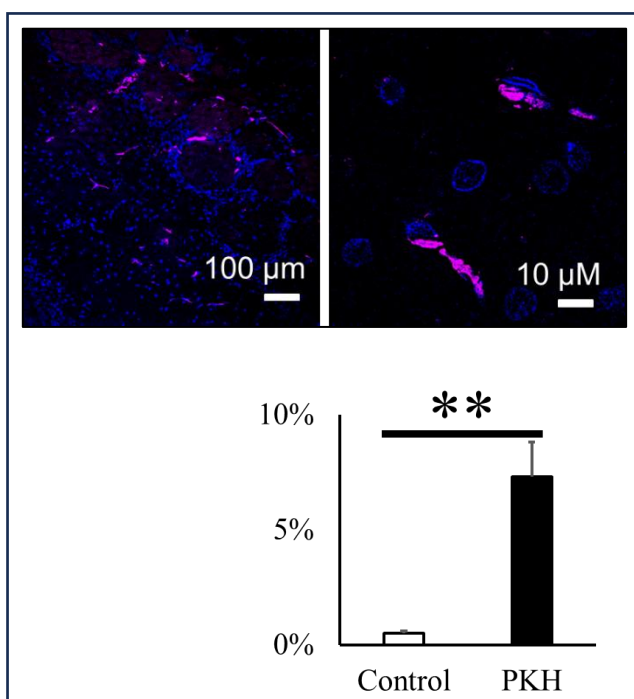


図 20 PKH26 で標識したエクソソームの脳内分布画像 (上) とその定量解析結果 (下)

嗅神経の常在細胞の約 7% が PKH26 シグナルを示した

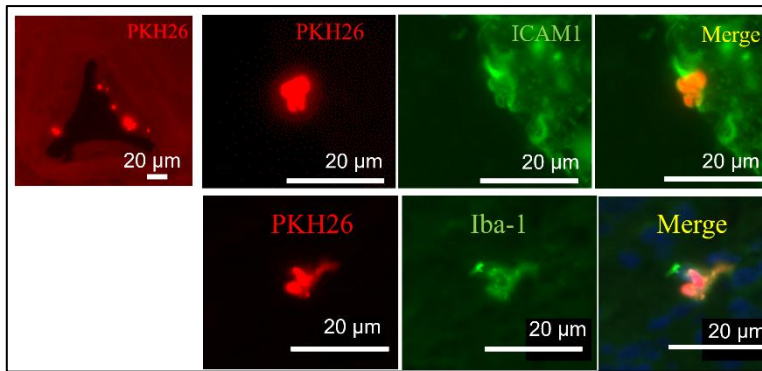


図 21 PKH26 と ICAM1
(上)、PKH26 と Iba-1
(下) の共免疫組織化学
染色

PKH26 標識エクソソーム
は脳の血管内皮細胞お
よびミクログリア内にも
取り込まれていたことが
示唆された

考察

本研究では、間葉系幹細胞由来のエクソソームを経鼻投与することで神経炎症が軽減され、くも膜下出血後の空間認知記憶障害が抑制されることを示した。エクソソームは嗅神経と三叉神経を介してくも膜下出血による損傷脳に吸収され、ミクログリア細胞と内皮細胞に取り込まれたことが示唆された。

短期および長期の記憶障害を含む認知機能障害は、くも膜下出血を乗り越え生存した患者にとって最も重大な後遺症である。ヒトと動物モデルの両方において、海馬 CA1 領域の損傷がこれらの症状の原因であると考えられている (Han et al., 2014) (Sasaki et al., 2016) (Takata et al., 2008)。

CA1 ニューロンが急性損傷に対して本質的に脆弱であることに加え、最近のエビデンスでは、ミクログリアの炎症反応も神経細胞死に寄与し、最初の損傷から 1~3 日後に起こる可能性が示唆されている (Chen et al., 2023a, Chen et al., 2023b) (Fang et al., 2024)。間葉系幹細胞由来のエクソソームは、さまざまな神経疾患において海馬損傷を軽減することが示されている。その機序としては抗アポトーシス作用、アストロサイトおよびミクログリアの不活性化、血液脳関門の完全性の維持、神経新生の促進、シナプス形成の促進など、複数の機序が報告されている (Chen et al., 2023b) (Yang et al., 2022) (Zhao et al., 2020)。我々の研究結果は過去の報告と一致しており、エクソソームがグリア細胞やミクログリアに対して強力な抗炎症作用を発揮し、CA1 損傷を回復させることを示唆している。また、エクソソーム群において皮質ニューロンが維持されていることも明らかになった。これらはくも膜下出血患者の認知機能の維持にも寄与する可能性がある。

経鼻投与は、脳への薬物送達の有望な経路としてますます認識されている。経鼻投与と静脈内投与における間葉系幹細胞由来エクソソームの有効性を比較した研究もいくつかある。興味深いことに、ほとんどの研究で、経鼻投与後のエクソソームは静脈内移植後と比較して脳内で有意に多く存在することが明らかになっている (Betzer et al., 2017) (Bonafede et al., 2020) (Ioannides et al., 2020) (Liang et al., 2020) (Perets et al., 2018) (Tolomeo et al., 2023)。静脈内移植されたエクソソームは肝臓や脾臓に蓄積する傾向があるが、鼻腔内投与されたエクソソームは主に脳に集中することが示唆されている (Liang et al., 2020)。本研究でも脳にエクソソームが分布しており過去の報告と一致した結果となっている。過去の報告では IRDye® 800CW という蛍光物質により標識したエクソソームの鼻腔内投与により、投与後 30 分ほどで脳全体でエクソソームを検出できたとの報告がされている (Thomi et al., 2019)。しかし本研究では PET / CT による評価でエクソソームは経鼻投与 1 時間後には頭蓋内分布することが確認できず、3 時間後に嗅球に分布することが示唆された。過去の研究は Ex

vivo での研究であり、PET/CT の評価のエクソソームの検出閾値は Ex vivo の評価と比べ劣っている可能性はある。

経鼻投与には、細胞内経路と細胞外経路という 2 つの異なる経路が関与することが報告されている (Dhuria et al., 2010)。細胞内経路は、嗅覚感覚ニューロンまたは三叉神経ニューロンへのエンドサイトーシスに続き、軸索に沿って篩骨板を通して嗅神経または直接橋へとニューロン内輸送される。以前の研究では、アルツハイマー病のマウスモデルに経鼻投与された PKH26 標識間葉系幹細胞由来エクソソームの大部分が、未熟な嗅覚感覚ニューロン層に蓄積し、その後、脳の深部領域へと輸送されることが示唆されている (Ma et al., 2020)。ただし、軸索輸送やニューロン内の輸送に関して詳細な機序を明らかにするような研究は狩猟しえる限りみつからなかった。一方、細胞外経路には、鼻粘膜下の毛細血管への吸収を介して全身循環に入る血管内経路や、嗅神経細胞周囲の細胞間溝から脳脊髄液に入り脳間質腔、脳室周囲腔に入り込む込む経路や、同様の機序で脳脊髄液に入った後、脳のリンパ系として機能している血管周囲腔に分布し、脳動脈の拍動による起こる血管周囲ポンプ作用によって脳全体に分布する経路が考えられる (Dhuria et al., 2010)。細胞外経路に関しても細胞間溝、血管内、血管周囲腔、脳間質腔、脳室周囲腔いずれの分布に関しても詳細な機序を明らかにした研究を狩猟できなかった。細胞内経路・細胞外経路ともにエクソソームの分布経路に関しては今後の知見の蓄積が期待される。

本研究では、嗅球の強く集積と大脳の血管壁に標識されたエクソソームが大量に存在した経緯から、細胞外経路による輸送が示唆される。さらに、エクソソームがミクログリアに取り込まれることが観察できたが、これは Betzer らの研究結果と一致している (Betzer et al., 2017)。Betzer らは、金ナノ粒子を使用して鼻腔内投与されたエクソソームを追跡し、移植後 24 時間まで、特に炎症部位の周囲でエクソソームの蓄積が継続的に増加することを観察し、本研究ではその結果と一致した。エクソソームの蓄積が炎症によって引き起こされることを考えると、鼻腔内投与は炎症を特徴とする急性脳疾患を緩和するのに理想的な方法である可能性がある。(Rohden et al., 2021)。

これまでくも膜下出血に対するエクソソームの経鼻投与の研究は存在しなかった。本研究がくも膜下出血に対するエクソソームの経鼻投与が神経機能の改善や神経炎症の抑制をすることを示した初めての報告である。また先に述べたように金ナノ粒子などで頭蓋内のエクソソーム移行を示した研究は存在したが、PET/CT やオトリラジオグラフィーを使用して定量的および脳神経を含めてエクソソームの分布を示した研究は本研究がはじめてである。今回の研究により、In vivo や Ex vivo でのエクソソームの頭蓋内分布が定量的・経時的および詳細に観察できることが示唆され、今後のエクソソーム研究への応用が期待される。

本稿には考慮すべき限界がいくつかある。第一に、エクソソームが消化管や他の臓器から吸収され、全身循環を経て神経炎症やアポトーシスを抑制した可能性が排除できない。PET/CTにて食道に一定量のエクソソームが検出されたためである。投与された液体の総量が多すぎた可能性があり、十分な吸収のために量と投与時間・投与期間を最適化する必要がある。第二に、本研究はエクソソームが早期脳損傷に及ぼす影響に焦点を当てていたため、7日間を超える神経学的障害を追跡することはできなかった。しかしながら、機能回復をより包括的に理解するには、より長期的なモニタリングが不可欠である。第三に、抗炎症効果をもたらすエクソソームの具体的な内容を完全に解明することはできなかった。microRNAの一種である microRNA125a-3p は好中球の活性化を抑制し、抗炎症に寄与することが以前に報告されている (Morishima et al., 2024)。本研究では、エクソソーム内の microRNA などの含有物の、ミクログリアの不活性化等に対して効果を研究するまでには至らなかった。作用機序を完全に解明するには、さらなる実験が必要である。

結論

本研究全体から得られた新知見

- ・くも膜下出血の動物モデルで、エクソソームの経鼻投与が海馬 CA1 領域の神経細胞死の抑制や、神経炎症の抑制に寄与することを初めて示した。
- ・経鼻投与されたエクソソームが嗅球内に観察されることを PET/CT により初めて示した。
- ・経鼻投与されたエクソソームが嗅球のみならず三叉神経や脳幹、および大脳にも検出されることをオートラジオグラフィーで初めて示した。

新知見の意義

海馬 CA1 領域の神経細胞死を抑制したことから、くも膜下出血を乗り越え生存した患者にとって最も重大な後遺症である認知機能障害に対し、くも膜下出血早期における間葉系幹細胞由来のエクソソームの経鼻投与が新たな治療選択肢になる可能性がある。また本研究では生体内でのエクソソームの頭蓋内移行性の定量的な評価に PET/CT が非常に有用であることを示唆した。またオートラジオグラフィーにより脳や脳神経のエクソソームの分布がより詳細に把握することができることが示唆されたため、エクソソームの頭蓋内分布の機序がより詳細になるための手法としてオートラジオグラフィーが有用であることが示唆された。これらが神経疾患に対するエクソソーム研究が今後進歩するための大きな福音になる可能性がある。

今後の研究の展望

本研究では、間葉系幹細胞由来のエクソソーム、特に羊膜由来の間葉系幹細胞由来のエクソソームの神経炎症抑制効果が示唆されており、microRNA などのエクソソーム含有物に注目した、その分子機序が同定されることを期待する。PET/CT やオートラジオグラフィー、および PKH26 などの標識物質を使用することで定量的にエクソソームの頭蓋内分布が測定可能なため、より頭蓋内移行性が高いエクソソームの開発の研究が進むことを期待する。

今後の課題

本研究では、神経炎症抑制効果を十分に発揮するためのエクソソームの適切な投与回数や間隔、用量などを明らかにしていないため、これらが今後の課題になると思われる。

またヒトへのエクソソーム投与を臨床応用する際には、今回の研究により採取したエクソソーム量よりもはるかに大きな量の採取が必要になると思われる。品質を維持したまま大量にエクソソームを採取する手法の確立などが課題になると思われる。

謝辞

本研究は、JSPS 日本学術振興会 科学研究費助成事業（科研費）（課題番号 23K08535）の助成を受けたものである。

利益相反

この研究で使用したヒト羊膜由来間葉系幹細胞は Kaneka Corporation（大阪府、日本）から提供を受けたものである。

引用文献

- ARAKAWA, M., SAKAMOTO, Y., MIYAGAWA, Y., NITO, C., TAKAHASHI, S., NITAHARA-KASAHARA, Y., SUDA, S., YAMAZAKI, Y., SAKAI, M., KIMURA, K. & OKADA, T. 2023. iPSC-derived mesenchymal stem cells attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory signaling and oxidative stress. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 30, 333-349.
- BETZER, O., PERETS, N., ANGEL, A., MOTIEI, M., SADAN, T., YADID, G., OFFEN, D. & POPOVTZER, R. 2017. In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 11, 10883-10893.
- BLEDNOV, Y. A., STOFFEL, M., COOPER, R., WALLACE, D., MANE, N. & HARRIS, R. A. 2002. Hyperactivity and dopamine D1 receptor activation in mice lacking *girk2* channels. *Psychopharmacology (Berl)*, 159, 370-8.
- BONAFEDE, R., TURANO, E., SCAMBI, I., BUSATO, A., BONTEMPI, P., VIRLA, F., SCHIAFFINO, L., MARZOLA, P., BONETTI, B. & MARIOTTI, R. 2020. ASC-Exosomes Ameliorate the Disease Progression in SOD1(G93A) Murine Model Underlining Their Potential Therapeutic Use in Human ALS. *Int J Mol Sci*, 21.
- CHEN, P., LIU, X. Y., LIN, M. H., LI, Y. X., KANG, D. Z., YE, Z. C. & LIN, Q.

- S. 2023a. NeuroD1 administration ameliorated neuroinflammation and boosted neurogenesis in a mouse model of subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*, 20, 261.
- CHEN, S., WANG, X., QIAN, Z., WANG, M., ZHANG, F., ZENG, T., LI, L. & GAO, L. 2023b. 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, M. Y., KIM, D. H., YUN, H., OH, B. K., KIM, S. B., SONG, I. H., PARK, H. S., KIM, S. E., PARK, C. & CHOI, C. 2022. Quantitative Biodistribution and Pharmacokinetics Study of GMP-Grade Exosomes Labeled with (89)Zr Radioisotope in Mice and Rats. *Pharmaceutics*, 14.
- DHURIA, S. V., HANSON, L. R. & FREY, W. H., 2ND 2010. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*, 99, 1654-73.
- FANG, D., GUO, S., WEI, B., LIU, W., LI, G., LI, X., LIU, J., JIN, L. & DUAN, C. 2024. Nrf-2 modulates excitability of hippocampal neurons by regulating ferroptosis and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res Bull*, 207, 110877.
- FEIGIN, V. L., LAWES, C. M., BENNETT, D. A., BARKER-COLLO, S. L. &

- PARAG, V. 2009. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*, 8, 355-69.
- HAN, S. M., WAN, H., KUDO, G., FOLTZ, W. D., VINES, D. C., GREEN, D. E., ZOERLE, T., TARIQ, A., BRATHWAITE, S., D'ABBONDANZA, J., AI, J. & MACDONALD, R. L. 2014. Molecular alterations in the hippocampus after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34, 108-17.
- IKEDA, T., KAWABORI, M., ZHENG, Y., YAMAGUCHI, S., GOTOH, S., NAKAHARA, Y., YOSHIE, E. & FUJIMURA, M. 2024. Intranasal Administration of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Alleviates Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Pharmaceutics*, 16.
- IOANNIDES, P., GIEDZINSKI, E. & LIMOLI, C. L. 2020. Evaluating different routes of extracellular vesicle administration for cranial therapies. *J Cancer Metastasis Treat*, 6.
- ISHIBASHI, K., ICHINOSE, T., KADOKAWA, R., MIZUTANI, R., IWABUCHI, S., TOGI, S., URA, H., TANGE, S., SHINJO, K., NAKAYAMA, J., NANJO, S., NIIDA, Y., KONDO, Y., HASHIMOTO, S., SAHAI, E., YANO, S., NAKADA, M. & HIRATA, E. 2024. Astrocyte-

induced mGluR1 activates human lung cancer brain metastasis via glutamate-dependent stabilization of EGFR. *Dev Cell*.

KARINO, K., KONO, M., TAKEYAMA, S., KUDO, Y., KANDA, M., ABE, N., ASO, K., FUJIEDA, Y., KATO, M., OKU, K., AMENGUAL, O. & ATSUMI, T. 2023. Inhibitor of NF-kappaB Kinase Subunit epsilon Contributes to Neuropsychiatric Manifestations in Lupus-Prone Mice Through Microglial Activation. *Arthritis Rheumatol*, 75, 411-423.

KAWABORI, M., KACIMI, R., KAUPPINEN, T., CALOSING, C., KIM, J. Y., HSIEH, C. L., NAKAMURA, M. C. & YENARI, M. A. 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, 3384-96.

KAWABORI, M., KURODA, S., SUGIYAMA, T., ITO, M., SHICHINOHE, H., HOUKIN, K., KUGE, Y. & 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, 217-26.

KAWABORI, M., SHICHINOHE, H., KAHATA, K., MIURA, A., MAEDA, K., ITO, Y. M., MUKAINO, M., KOGAWA, R., NAKAMURA, K., GOTOH,

- S., KURISU, K. & FUJIMURA, M. 2024. Phase I/II trial of intracerebral transplantation of autologous bone marrow stem cells combined with recombinant peptide scaffold for patients with chronic intracerebral haemorrhage: a study protocol. *BMJ Open*, 14, e083959.
- KAWABORI, M., SHICHINOHE, H., KURODA, S. & HOUKIN, K. 2020. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci*, 21.
- KONNO, K., YAMASAKI, M., MIYAZAKI, T. & WATANABE, M. 2023. Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. *Sci Adv*, 9, eadf7084.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H. & OCHIYA, T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101, 2087-92.
- LAI, N., WU, D., LIANG, T., PAN, P., YUAN, G., LI, X., LI, H., SHEN, H., WANG, Z. & CHEN, G. 2020. Systemic exosomal miR-193b-3p delivery attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *J Neuroinflammation*, 17, 74.
- LAUZIER, D. C., JAYARAMAN, K., YUAN, J. Y., DIWAN, D., VELLIMANA, A. K., OSBUN, J. W., CHATTERJEE, A. R., ATHIRAMAN, U., DHAR,

- R. & ZIPFEL, G. J. 2023. Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Incidence and Mechanisms. *Stroke*, 54, 1426-1440.
- LIANG, Y., DUAN, L., XU, X., LI, X., LIU, M., CHEN, H., LU, J. & XIA, J. 2020. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Treatment of Autism Spectrum Disorder. *ACS Appl Bio Mater*, 3, 6384-6393.
- LIU, Z., WANG, B. & GUO, Q. 2021. MiR-26b-5p-modified hUB-MSCs derived exosomes attenuate early brain injury during subarachnoid hemorrhage via MAT2A-mediated the p38 MAPK/STAT3 signaling pathway. *Brain Res Bull*, 175, 107-115.
- MA, X., HUANG, M., ZHENG, M., DAI, C., SONG, Q., ZHANG, Q., LI, Q., GU, X., CHEN, H., JIANG, G., YU, Y., LIU, X., LI, S., WANG, G., CHEN, H., LU, L. & GAO, X. 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.
- MARQUEZ-CURTIS, L. A. & ELLIOTT, J. A. W. 2024. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects: Update from 2015 review. *Cryobiology*, 115, 104856.
- 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.
- MORISHIMA, Y., KAWABORI, M., YAMAZAKI, K., TAKAMIYA, S.,
YAMAGUCHI, S., NAKAHARA, Y., SENJO, H., HASHIMOTO, D.,
MASUDA, S., FUJIOKA, Y., OHBA, Y., MIZUNO, Y., KUGE, Y. &
FUJIMURA, M. 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.
- NEIFERT, S. N., CHAPMAN, E. K., MARTINI, M. L., SHUMAN, W. H.,
SCHUPPER, A. J., OERMANN, E. K., MOCCO, J. & MACDONALD, R.
L. 2021. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: the Last Decade. *Transl
Stroke Res*, 12, 428-446.
- PERETS, N., HERTZ, S., LONDON, M. & OFFEN, D. 2018. Intranasal
administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells
ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. *Mol Autism*, 9, 57.
- PRUNELL, G. F., MATHIESEN, T. & SVENDGAARD, N. A. 2002. A new
experimental model in rats for study of the pathophysiology of
subarachnoid hemorrhage. *Neuroreport*, 13, 2553-6.
- SASAKI, T., HOFFMANN, U., KOBAYASHI, M., SHENG, H., ENNACEUR,

- A., LOMBARD, F. W. & WARNER, D. S. 2016. Long-Term Cognitive Deficits After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Neurocrit Care*, 25, 293-305.
- SHEN, R., ZHOU, J., LI, G., CHEN, W., ZHONG, W. & CHEN, Z. 2020. SS31 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage possibly by the mitochondrial pathway. *Neurosci Lett*, 717, 134654.
- SMOLENSKY, I. V., ZUBAREVA, O. E., KALEMENEV, S. V., LAVRENTYEVA, V. V., DYOMINA, A. V., KAREPANOV, A. A. & ZAITSEV, A. V. 2019. Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res*, 372, 112044.
- SUKHANOVA, I. A., SEBENTSOVA, E. A., KHUKHAREVA, D. D., VYSOKIKH, M. Y., BEZUGLOV, V. V., BOBROV, M. Y. & LEVITSKAYA, N. G. 2019. Early-life N-arachidonoyl-dopamine exposure increases antioxidant capacity of the brain tissues and reduces functional deficits after neonatal hypoxia in rats. *Int J Dev Neurosci*, 78, 7-18.
- TAKAMIYA, S., KAWABORI, M., KITAHASHI, T., NAKAMURA, K., MIZUNO, Y., YASUI, H., KUGE, Y., TANIMORI, A., TAKAMATSU, Y.,

- YUYAMA, K., SHICHINOHE, H. & FUJIMURA, M. 2022a. Intracerebral Transplantation of Mesenchymal Stromal Cell Compounded with Recombinant Peptide Scaffold against Chronic Intracerebral Hemorrhage Model. *Stem Cells Int*, 2022, 8521922.
- TAKAMIYA, S., KAWABORI, M., YAMAZAKI, K., YAMAGUCHI, S., TANIMORI, A., YAMAMOTO, K., OHNISHI, S., SEKI, T., KONNO, K., THA, K. K., HASHIMOTO, D., WATANABE, M., HOUKIN, K. & FUJIMURA, M. 2022b. Intravenous transplantation of amnion-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery and alleviates intestinal dysfunction after spinal cord injury. *PLoS One*, 17, e0270606.
- TAKATA, K., SHENG, H., BOREL, C. O., LASKOWITZ, D. T., WARNER, D. S. & LOMBARD, F. W. 2008. Long-term cognitive dysfunction following experimental subarachnoid hemorrhage: new perspectives. *Exp Neurol*, 213, 336-44.
- TAUFIQUE, Z., MAY, T., MEYERS, E., FALO, C., MAYER, S. A., AGARWAL, S., PARK, S., CONNOLLY, E. S., CLAASSEN, J. & SCHMIDT, J. M. 2016. Predictors of Poor Quality of Life 1 Year After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery*, 78, 256-64.
- THOMI, G., JOERGER-MESSERLI, M., HAESLER, V., MURI, L., SURBEK, D.

- & 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.
- TKACH, M. & THERY, C. 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164, 1226-1232.
- TOLOMEO, A. M., ZUCCOLOTTO, G., MALVICINI, R., DE LAZZARI, G., PENNA, A., FRANCO, C., CAICCI, F., MAGAROTTO, F., QUARTA, S., POZZOBON, M., ROSATO, A., MURACA, M. & COLLINO, F. 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.
- TSUBOI, M. & GOTOH, Y. 2021. Analysis of histone modifications in mouse neocortical neural progenitor-stem cells at various developmental stages. *STAR Protoc*, 2, 100763.
- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- WANG, Z., HIGASHIKAWA, K., YASUI, H., KUGE, Y., OHNO, Y., KIHARA,

- A., MIDORI, Y. A., HOUKIN, K. & KAWABORI, M. 2020. FTY720 Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury by Preventing the Redistribution of Tight Junction Proteins and Decreases Inflammation in the Subacute Phase in an Experimental Stroke Model. *Transl Stroke Res*, 11, 1103-1116.
- XIONG, L., SUN, L., ZHANG, Y., PENG, J., YAN, J. & LIU, X. 2020. Exosomes from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can Alleviate Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage Through miRNA129-5p-HMGB1 Pathway. *Stem Cells Dev*, 29, 212-221.
- YANG, H., TU, Z., YANG, D., HU, M., ZHOU, L., LI, Q., YU, B. & 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.
- ZHAO, H., LI, Y., CHEN, L., SHEN, C., XIAO, Z., XU, R., WANG, J. & LUO, Y. 2019. HucMSCs-Derived miR-206-Knockdown Exosomes Contribute to Neuroprotection in Subarachnoid Hemorrhage Induced Early Brain Injury by Targeting BDNF. *Neuroscience*, 417, 11-23.
- ZHAO, Y., GAN, Y., XU, G., HUA, K. & LIU, D. 2020. Exosomes from MSCs

overexpressing microRNA-223-3p attenuate cerebral ischemia through inhibiting microglial M1 polarization mediated inflammation. *Life Sci*, 260, 118403.