



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



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 後 藤 秀 輔

学 位 論 文 題 名

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)

【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 日まで神経機能を評価し、抗アポトーシス効果および抗炎症効果を評価するため、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、認知機能が著しく改善した。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 投与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の少ないことから、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、くも膜下出血後の認知機能が維持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により In vivo や Ex vivo での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神経アポトーシスを抑制し認知機能障害の改善す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ることが示唆された。