

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17020

研究課題名(和文)脳梗塞後慢性期における新規治療としてのグリア細胞由来エクソソームの検討

研究課題名(英文)Glial cell-derived exosomes as a new treatment in the chronic phase after stroke

研究代表者

平 健一郎(Hira, Kenichiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60821725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞由来エクソソームの脳梗塞慢性期機能改善効果メカニズムの検討では成果が得られなかった。そこで、循環する血清由来エクソソームに着目した。MCAO前のエクソソーム(Pre-exo)に比べ、MCAO28日後のエクソソーム(28-day-exo)ではタンパク量の増加を認めた。培養神経細胞にOGD後28-day-exoを投与することで有意に軸索伸長を認め、培養アストロサイトではS100A10陽性細胞の増加とC3d陽性細胞の減少を認めた。MCAO後亜急性期に28-day-exoを投与したところ神経徴候と運動機能の改善を認めた。梗塞後慢性期血清由来エクソソームは脳梗塞慢性期新規治療となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームはmiRNAなどの情報を含有する細胞間伝達分子として各疾患治療に応用されているが、効果実証は近距離における限定的なものである。しかし、エクソソーム内でmiRNAは安定していることから、遠距離をターゲットとした治療法の開発が実現可能と考えた。さらに、単一細胞由来のエクソソームによる直接的な機能回復効果のみならず、循環するエクソソームを介した全身の諸臓器との相互作用に着目するという点でより実臨床に近い形で最大限の機能改善効果が期待できると考えた。本研究では、エクソソームの経静脈的投与による脳梗塞後慢性期機能回復効果の実証により遠距離をターゲットとした治療法の開発に近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of functional recovery treated with glial cell-derived exosomes in the chronic phase after stroke were not elucidated. Therefore, we focused on serum-derived exosomes circulating in the blood. The amount of protein was increased in the 28-day-exo group compared with the Pre-exo group. In primary cultured neurons, 28-day-exo treated neurons had significantly elongated axons compared to the OGD group. In primary cultured astrocytes, S100A10 positive cells increased and C3d positive astrocytes decreased in 28-day-exo treated group compared to the OGD group. In animal models, neurological manifestation and motor function were significantly improved in the 28-day-exo group compared with the vehicles. Serum-derived exosomes may be a novel treatment to promote recovery during the chronic phase after stroke.

研究分野：脳卒中

キーワード：エクソソーム 脳梗塞慢性期 軸索再生 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は急成長を遂げた急性期治療の反面、慢性期における治療はなく、依然として脳血管疾患は要介護原因の第2位であり、十分な機能回復が得られていない。そのため、脳梗塞慢性期機能回復を目的とした新規治療薬の開発が喫緊の課題と言える。

脳梗塞慢性期の機能回復において、軸索再生及びシナプスの再形成が必要である。そのため、神経細胞-グリア細胞間相互作用が極めて重要であるが、グリア瘢痕、神経再生阻害因子などが機能回復を困難なものにしている。申請者は軸索再生阻害因子の一つである Semaphorin 3A (Sema3A)に着目し、先行研究により Sema3A 阻害薬が脳梗塞後慢性期の peri-infarct area において軸索再生効果を有することを発見した。さらに、初代神経細胞培養において、Sema3A 阻害薬が虚血後アストロサイトの活性化やアストロサイトから分泌されるエクソソーム内 microRNA を制御することで、神経細胞内 ptgds を介して虚血負荷後、軸索を再生させる新規メカニズムを解明した。

2. 研究の目的

グリア細胞由来のエクソソームを脳梗塞後慢性期における新規治療として応用することを達成するため、エクソソーム内 microRNA の網羅的解析と、関連する軸索再生促進因子の検討、さらには脳梗塞後ラットへのエクソソーム投与を行い、慢性期における機能改善効果を検討する。

3. 研究の方法

初代アストロサイト培養では、無糖無酸素負荷(Oxygen Glucose Deprivation: OGD)後 Sema3A 阻害薬投与群と未投与群を作製し、各アストロサイトから分泌されたエクソソーム内の microRNA を網羅的に解析し、Sema3A 阻害薬投与群のエクソソーム内で減少する microRNA を同定する。同定された microRNA の inhibitor をアストロサイトに導入し、そのアストロサイトから分泌されるエクソソームを初代培養神経細胞に投与し、軸索伸張効果を検討する。動物実験では脳梗塞モデルラットにエクソソームを投与し、脳梗塞後慢性期機能改善効果を検討する。

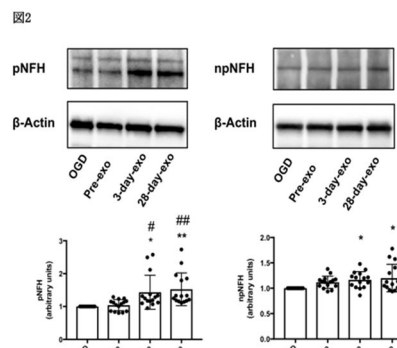
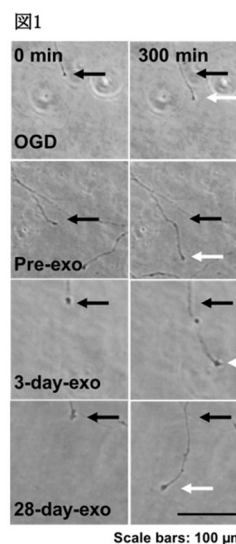
4. 研究成果

Sema3A 阻害薬を投与した OGD 後アストロサイトから分泌されたエクソソーム内では miR-30c-2-3p、miR-326-5p が有意に減少していた。次に microRNA inhibitor をエレクトロポレーションにて培養アストロサイトに導入し、分泌されたエクソソームを OGD 後初代培養神経細胞に投与した。しかしながら、有意な軸索伸張効果、軸索再生関連タンパクの増加は認められなかった。

エクソソームは既存の神経構築を活かしながら再生を誘導でき、免疫原性が少ないといった利点を有する一方で、ターゲティングが弱く、その効果は限定的である可能性が示唆されている。よって、単一細胞由来のエクソソームによる直接的な機能改善効果のみならず、神経細胞-グリア細胞間、さらに循環するエクソソームを介した全身の諸臓器との相互作用に着目することで、エクソソームによる最大限の機能改善効果が期待できると考えた。そこで、脳梗塞後ラットの全血血清由来のエクソソームを抽出し、脳梗塞後慢性期における機能改善効果の検討を行った。

9週雄性Wistar STラットのPre-operatedモデル(Pre-exo群)、MCAO3日モデル(3-day-exo群)、28日モデル(28-day-exo群)を作製し全血7mlの血清由来エクソソームを抽出した。初めに、総エクソソーム数と総蛋白量を比較したところ、3-day-exo群はPre-exo群と比較し有意に減少した(p<0.001)。一方で28-day-exo群では3-day-exo群と比較し有意に増加した(p<0.001)。総蛋白量は28-day-exo群でPre-exo群、3-day-exo群と比較し有意に増加した(p<0.001)。

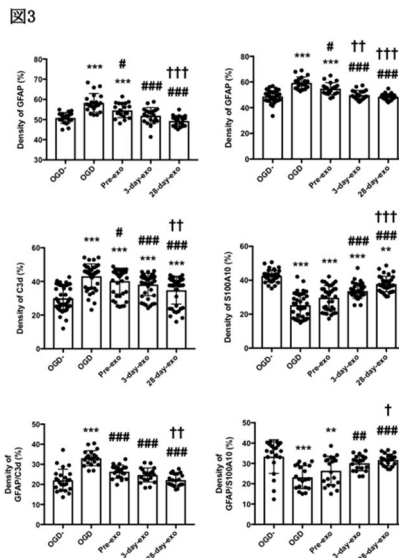
初代培養神経細胞では、OGD後に各エクソソームを投与し、96時間後の軸索進展効果と神経細胞関連蛋白の発現を解析した。各エクソソーム投与群ではOGD群と比較し有意に軸索進展効果が得られ(図1)、3-day-exo群と28-day-exo群ではOGD群と比較し軸索のマーカである phosphorylated neurofilament heavy chain (pNFH) と樹状突起のマーカである non-phosphorylated neurofilament heavy chain (npNFH) が有意に増加した(図2)。以上より血清由来の工



N=5/group. Values are the mean±SD. *P<0.05, **P<0.01 vs OGD; ***P<0.001 vs OGD; #p<0.05, ##p<0.01 vs Pre-exo.

クソソームではOGD後軸索伸張効果を認め、さらに3-day-exo群と28-day-exo群では軸索再生効果を有する可能性が示唆された。また、軸索再生効果にはエクソソーム内タンパクの増加が関与する可能性が示唆された。

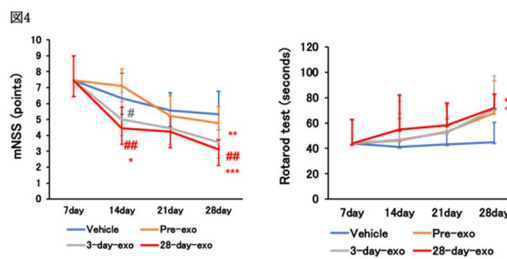
近年では脳梗塞後癒痕を形成するGFAP陽性活性化アストロサイトには少なくとも神経回路の再生を促進するアストロサイト(S100A10陽性A2アストロサイト)と神経障害作用を持つアストロサイト(C3d陽性A1アストロサイト)の少なくとも2種類が存在することが明らかとなった(Liddel SA, Nature, 2017)。そこで初代アストロサイト培養ではOGD後に各エクソソームを投与し、96時間後のアストロサイトの機能的変化を蛍光免疫染色にて検討した。GFAP陽性活性化アストロサイトはOGD後有意に増加し、各エクソソーム投与にて有意に減少した。C3d陽性アストロサイトもOGD後有意に増加し、各エクソソーム投与にて有意に減少した。一方で、S100A10陽性アストロサイトはOGD後有意に減少し、3-day-exo群と28-day-exo群でOGD群と比較し有意に増加した(図3)。ウエスタンブロッティングにおいてもGFAPはOGD後各エクソソーム投与にてOGD群と比較し有意に減少し(p<0.001)、C3dはOGD群、Pre-exo群と比較し有意に減少した(p<0.01)。一方でS100A10はOGD群と比較し3-day-exo群と28-day-exo群で有意に増加した(p<0.01)。



N = 5/group. Values are the mean \pm SD. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus OGD; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 versus OGD; †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 versus Pre-exo. Scale bars: 50 μ m.

以上より、3-day-exo群と28-day-exo群ではOGD後C3d陽性A1アストロサイトの減少とS100A10陽性A2アストロサイトの増加が認められ、軸索伸長・軸索再生効果に加えA1アストロサイトの減少とA2アストロサイトの増加によりOGD後神経保護効果をもたらす可能性が示唆された。

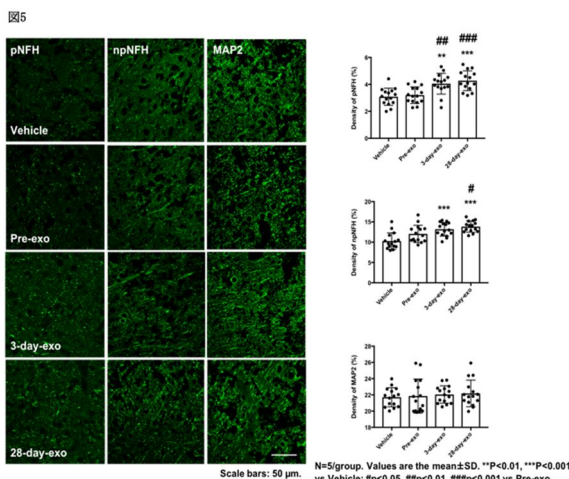
動物実験では9週雄性Wistar STラットを用い永久的middle cerebral artery occlusion (MCAO)モデルを作製し、MCAO7日後に尾静脈より各エクソソームを投与することで、神経徴候をmodified neurological severity score (mNSS)にて解析し、運動機能をRotarod testにて解析した。また、ischemic coreより300 μ mのperi-infarct areaにおける軸索再生とアストロサイトの機能的変化を検討した。



N=9/group. Values are the mean \pm SD. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Vehicle; #p<0.05, ##p<0.01 vs Pre-exo.

神経徴候と運動機能はMCAO28日後において、3-day-exo群と28-day-exo群でVehicle群と比較し有意な改善を認めた(図4)。Vehicle群と各エクソソーム投与群で体重の変化は認めなかった。

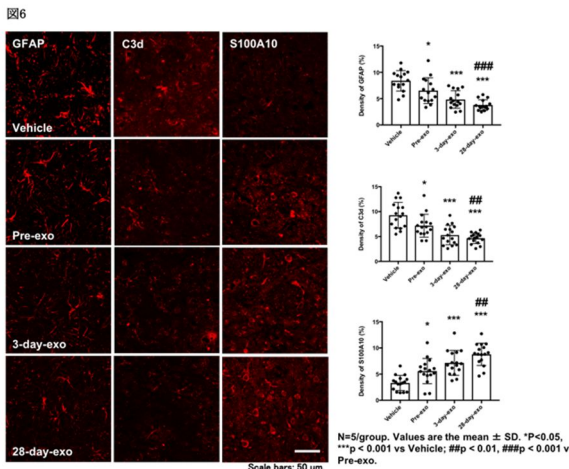
Peri-infarct areaでの蛍光免疫染色では、pNFH陽性細胞とnpNFH陽性細胞は3-day-exo群と28-day-exo群でVehicle群と比較し有意に増加した。一方で神経細胞マーカーのMAP2には変化は認められなかった(図5)。GFAP陽性細胞は各エクソソーム投与群でVehicle群と比較し有意に減少し、C3d陽性細胞においても各エクソソーム投与群で、Vehicle群と比較し有意に減少した。S100A10陽性細胞は各エクソソーム投与群においてVehicle群と比較し有意に増加した(図6)。



N=5/group. Values are the mean \pm SD. **P<0.01, ***P<0.001 vs Vehicle; #p<0.05, ##p<0.01 vs Pre-exo.

< 総括 >

MCAO3日後の脳梗塞急性期モデルラットの血清由来エクソソームと、MCAO28日後の脳梗塞慢性期モデルラットの血清由来エクソソーム内のタンパク量の増加は、脳梗塞慢性期における軸索再生効果と活性化アストロサイトのA1からA2への機能的変化により、神経徴候及び運動機能改善効果をもたらす可能性が示唆された。



N=5/group. Values are the mean \pm SD. **P<0.05, ***P<0.001 vs Vehicle; #p<0.01, ##p<0.001 vs Pre-exo.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平 健一郎
2. 発表標題 脳梗塞慢性期における新規治療としてのエクソソームの検討
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平 健一郎
2. 発表標題 Serum-derived exosomes treatment for functional recovery after stroke
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------