

低酸素低糖刺激後ヒト末梢血単核球エクソソーム中の miR-155-5p の低下

大津 裕

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：小野寺 理教授)

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町

通 1-757 新潟大学脳研究所神経内科学教室

内 大津 裕

Decreased miR-155-5p in exosomes from
human peripheral mononuclear cells
preconditioned by oxygen-glucose
deprivation

Yutaka OTSU

Niigata University Graduate School of
Medicine and Dental Science/ Course for
Molecular and Cellular Medicine/Molecular
Neuroscience and Brain Disease/ Neurology

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

Reprint requests to: Yutaka OTSU

Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, 1-757
Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata
951-8585, Japan

要旨

近年，脳梗塞患者の機能回復を促進する方法として，細胞療法が注目されている．当研究室では，低酸素低糖刺激（OGD）を加えたラット末梢血単核球（OGD-PBMC）が組織保護的な極性に変化し，脳梗塞ラットに経頸動脈投与することで脳内の血管内皮増殖因子（VEGF）増加を介して脳梗塞治療効果を有することを示した．一方で，低酸素条件下では，低酸素誘導因子（HIF-1 α ）の増加によりVEGFが増加することも報告されているが，OGD刺激を加えたPBMCで同様の機序が働いているかは検証されていなかった．また，PBMCと脳内常在細胞との細胞間相互作用の機序は明確ではなかった．そこで，OGD-PBMCの脳梗塞に対する治療効果の機序について，細胞間相互作用にエクソソームが関与していると想定し，HIF-1 α 発現とVEGF分泌に関わるmiRNAに注目して検討した．

ヒト OGD-PBMC を一過性局所脳梗塞モデルラットに経頸動脈投与して，脳内への生着を検証した．さらに，ミクログリアに対する極性変化の誘導の有無を，抗 VEGF 抗体を用いて蛍光免疫染色で検証した．次に，通常培養した PBMC (Normoxic-PBMC)，OGD-PBMC それぞれのエクソソーム由来の 200bp 以下の RNA を濃縮し，HIF-1 α の発現に關与する miRNA を比較した．その結果を踏まえ，HIF-1 α と VEGF を増加させる可能性のある miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与による阻害を行い，Normoxic-PBMC と OGD-PBMC における HIF-1 α と VEGF の発現をウエスタンブロッティングとルミネックスアッセイで評価した．

ヒト OGD-PBMC は，投与 3 日後には梗塞部位周囲で確認されたが，投与 21 日後には確認されなかった．一方，VEGF を発現しているミクログリアは Normoxic-PBMC 投与群に比して，OGD-PBMC 投与群で 3.9 倍に増加

した ($P < 0.05$). HIF-1 α または VEGF の発現増加に関わる miRNA の中で, 唯一 miR-155-5p が Normoxic-PBMC と比して, OGD-PBMC では 0.37 倍にダウンレギュレートしていた ($P = 0.01$). miR-155-5p 阻害を行ったヒト OGD-PBMC では, HIF-1 α の発現が 3 倍に増加した ($P < 0.05$). また, VEGF の発現も 1.36 倍に増加した ($P < 0.05$). 一方, Normoxic-PBMC では miR-155-5p 阻害にて HIF-1 α の発現は検出されなかった.

以上から, OGD-PBMC では, miR-155-5p の減少により HIF-1 α の発現が増加し VEGF の分泌が増加する. さらに, OGD-PBMC 投与による組織保護的極性の獲得にはエクソソームを介した細胞間情報伝達が関与している可能性が示唆された.

キーワード: 脳梗塞, 細胞療法, 末梢血単核球, 低酸素低糖刺激, miR-155-5p, HIF-1 α , VEGF

緒言

脳卒中は，世界で2番目に多い死亡原因であり¹⁾，70～80%が脳梗塞である．さらに，その約50%で重度の後遺症を残す²⁾．そのため，機能回復を促進する治療方法の開発が望まれている．

脳梗塞後遺症の機能回復療法において，細胞療法の有効性が報告されている³⁾⁴⁾．当研究室ではこれまで，軽度の脳梗塞類似刺激，すなわち低酸素低糖刺激 (oxygen-glucose deprivation, OGD) を加えたマウスミクログリアおよびラット末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を脳梗塞7日後のラットに末梢から投与したところ，症状の改善とともに，血管新生⁵⁾⁶⁾と軸索伸長⁷⁾⁻⁹⁾を認めることを見出した¹⁰⁾．

この機序には，組織のリモデリング因子である血管内皮成長因子 (VEGF) や，抗炎症性サイトカインであるトランスフォーミング因子- β (TGF- β) などの液性因子の関与

が考えられている。実際，当研究室では一過性局所脳梗塞モデルラットの脳梗塞組織において VEGF や TGF- β が上昇し，脳梗塞後 28 日まで持続していたことを示した¹¹⁾。

通常，低酸素刺激時の VEGF の増加は，転写因子 HIF-1 α の増加を介する¹²⁾。このことから，OGD-PBMC における組織保護効果発現時にも，HIF-1 α の増加を介して，VEGF を上昇させると想定した。

しかし，末梢投与の OGD-PBMC によって，何故，脳梗塞組織で VEGF が増加するか解明されていない。これには，細胞間のシグナル伝達系の関与が推定される。

近年，細胞間でのシグナル伝達機構として，エクソソームが注目されている³⁾⁶⁾¹³⁾¹⁴⁾。エクソソームは細胞外小胞のひとつで，miRNA や核酸，タンパク質などを含み，細胞間の情報伝達の一端を担っている¹⁵⁾。

実際，脳虚血動物モデルに対して幹細胞やミクログリア由来のエクソソームの有効性が

示され¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾、この機序としてエクソソームの含有する miRNA の関与が推定されている。特に、虚血時の反応に重要な役割を果たし、VEGF を誘導する HIF-1 α の制御に関わる、miR-376b-5p、miR-433、miR-335、miR-210、miR-155-5p が注目されている¹⁷⁾。

これらのことから私は、OGD-PBMC 療法では、OGD-PBMC 由来のエクソソーム中の miRNA を介して、障害組織の細胞で HIF-1 α が上昇し、VEGF の分泌を促進することで、保護効果を出すと考え、この仮説を検証した。

材料と方法

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け(#SA00706)、新潟大学動物実験指針および ARRIVE (Animal Research : Reporting In vivo Experiments) ガイドラインに従って実施した¹⁸⁾。

1 . 初代細胞培養

30代健康男性から末梢血を採取し，Ficoll-Paque PREMIUM（GE Healthcare，17-5446-02）を用いて，PBMCを遠心分離した．通常培養では，分離したPBMCをグルコース濃度4500mg/Lの培地を用いて，37℃で18時間培養した．

2 . 低酸素低糖刺激

分離したPBMCをグルコース濃度1000mg/Lの低グルコース培地とともに，低酸素チャンバー（Billups-Rothenburg，Del Mar，CA，USA）に入れ，95%窒素・5%二酸化炭素のガスを1時間充填した後，密封し37℃で18時間培養した．本方法にて，酸素濃度は1%未満に維持される¹¹⁾．

3 . 一過性局所脳虚血モデルラット

体重290～320gの8週令，雄性Sprague-Dawleyラットを用い，小泉法を用

いて一過性の局所脳虚血を誘発した。90分間の虚血の後、縫合糸を引き抜き再灌流させた。体温は直腸プローブを用いてモニターし、ヒーティングパッドを用いて $37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した (10)(11)。

4. ルミネックスアッセイ

培地中のタンパク発現量 (VEGF) をヒト Cytokine Premixed Kit A (funakoshi FCSTM03-06) を使用し、Luminex® 100/200™ システムを用いて測定した。

5. 蛍光免疫染色

脳梗塞 10 日後 (細胞投与 3 日後)、28 日後 (細胞投与 21 日後) のラットをイソフルラン過剰投与で安楽死させ、 4°C 生理食塩水と 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で還流し、脳を摘出した。摘出した脳をパラフィン包埋し、 $4\ \mu\text{m}$ 厚に薄切した。パラフィン標本をメタノールで処理後、オートクレーブ

(121°C, 10分間)で抗原賦活を行った。1%ウシ血清アルブミン・PBSで30分ブロッキングを行った後、一次抗体はヒト細胞質特異抗体(STEM121)(タカラバイオ Y40410, 1000倍希釈), ミクログリアに特異的で、単核球には反応しない抗 Transmembrane protein (TMEM) 119 抗体 (Novus Biologicals, NBP2-30551, 100倍希釈), 抗血管内皮増殖因子(VEGF)抗体(Santa Cruz, Sc-152, 500倍希釈)を用いて4°Cで一晩反応させた。蛍光標識された二次抗体(Alexa Fluor, 1000倍希釈)を室温で1時間反応させ、Vectashield 4', 6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で封入した。観察は二光子顕微鏡(LSM710; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で行った。VEGF陽性ミクログリア細胞数は、400倍の視野でN=3×7視野観察し、定量した。

6 . エクソソーム分離と miRNA 解析

ExoQuick precipitation kit (System Biosciences, CA, USA) を用いて , 条件培地からエクソソームを単離した . 単離後 , 2% 酢酸ウラニルで染色し , 透過型電子顕微鏡 (Hitachi H-7600, Hitachi, Japan) を用いて 100kV でエクソソームの撮像を行った .

Gene® RNA extraction reagent キット (Toray Industries, Kamakura, Japan) を用いて , エクソソーム内の RNA を抽出した . さらに , miRNesy mini kit (Qiagen) を用いて miRNA を含む 200bp 以下の長さの RNA を濃縮した . この RNA を 3D-Gene® miRNA labeling kit (Toray Industries, Kamakura, Japan) を用いて蛍光標識し , 3D-Gene® Human miRNA Oligo chip 25k ver2.2.0 (Toray Industries, Inc.) にて miRNA を定量した .

7 . miR-155-5p 阻害

miR-155-5p 阻害実験には，特異的ヒト-miR-155-5p アンチセンスオリゴヌクレオチド (miRCURY LNA, Qiagen, YI04101510-DDA) または miRNA 阻害剤コントロール (miRCURY LNA, Qiagen, YI00199006-DDA) を 6 ウェル細胞培養あたり 150 pmol/mL の濃度で使用した¹⁹⁾。

8. ウェスタンブロッティング

通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC), OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) を採取し, RIPA buffer (Santa Cruz) を用いてタンパク質を抽出した。また, OGD-PBMC, Normoxic-PBMC の条件培地を採取した。これらに 2-メルカプトエタノールを加えて煮沸した。Tris-glycine SDS-PAGE で電気泳動し, PVDF 膜に転写した後に, 5%スキムミルクと 0.1% Tween-20 を用いてブロッキングした。一次抗体で標識し, Horseradish peroxidase (HRP) 結合二次抗体

で標識した。一次抗体はマウスモノクローナル抗 HIF-1 α 抗体 (Biosciences, 610959, 500 倍希釈), ヤギポリクローナル抗アクチン抗体 (Santa Cruz, sc-1616, 5000 倍希釈) を使用した。ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Life Science) を用いてタンパクバンドを検出した。また, アクチンを内部コントロールとしてデンシトメトリーによってタンパク発現を半定量評価した。

エクソソーム分離後の溶液を上記と同様の処理をしてタンパクバンドを検出した。一次抗体はマウスモノクローナル抗 CD9 抗体 (MBL, MEX001-3, 20000 倍希釈), ウサギポリクローナル抗トランスフェリン抗体 (abcam, ab82411, 20000 倍希釈) を使用した。

9. 統計分析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で示した。miRNA 定量解析も含め 2 群間の比較には対応

のない t 検定を行った。3 群間以上の比較には一元分散分析 (ANOVA) 後、ボンフェローニのポストホックテストを使用して評価した。すべての統計解析は、IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (Armonk, NY, USA)を用いて行った。

結果

1. OGD-PBMC 投与時の、梗塞部周囲ミクログリアでの VEGF の発現

OGD-PBMC 投与による虚血脳組織での VEGF 発現を検討する目的で、一過性局所脳梗塞モデルラットに、ヒト由来 OGD-PBMC を経頸動脈的に投与した。投与 3 日後と 21 日後にヒト細胞マーカー STEM121 にて OGD-PBMC の蛍光免疫染色を行った。その結果、OGD-PBMC は、3 日後には梗塞部位周囲に観察されたが、21 日後には消失した (図 1A)。一方、21 日後の梗塞部位周囲では、ミクログリア抗体の TMEM119 と VEGF が共染

される細胞を認めた。陽性細胞数は，OGD-PBMC投与群で，コントロール群に比して，3.9倍に増加した（ $P < 0.05$ ）（図 1B）。

2. OGD-PBMC 由来エクソソーム中の miR-155-5p の検討

梗塞部位周囲のミクログリアでの VEGF 発現を誘導する因子として OGD-PBMC 由来エクソソームの関与を検討した。まず培養液中から，エクソソームを含む分画を抽出した。分画に，70nm 大の小胞を認めた（図 2A）。さらに，エクソソームのマーカーである CD9 の発現を確認した（図 2B）。一方，培地に含まれる糖蛋白であるトランスフェリンは検出されず（図 2B），培地を含まずにエクソソームが抽出できたと判定した。

次に，OGD 刺激，非刺激細胞由来のエクソソームから，200bp 以下の RNA を濃縮し，ヒト由来 miRNA を 2632 個検出可能な 3D-Gene® Human miRNA Oligo chip 25k

ver2.2.0 (Toray Industries, Inc.)にて定量した。両者の比較では、OGD刺激下で7.0% (183/2632)が増加、7.4% (195/2632)が減少していた。その中で、HIF-1 α またはVEGFの発現増加に関わるとして単離されているmiRNAに注目し¹⁷⁾²⁰⁾、その挙動を検討した。その結果、唯一miR-155-5pの低下を認めた (0.37, P=0.01) (表1)。

3. miR-155-5p低下のHIF-1 α 転写への影響

まずOGD-PBMC培養液中のVEGFと細胞内HIF-1 α の発現を検討した。Normoxic-PBMCに比して、OGD-PBMCでは、VEGFは3.4倍に増加した (P<0.01) (図3A)。また、HIF-1 α はNormoxic-PBMCでは認めなかったがOGD-PBMCでは発現を認めた (図3B)。

次に、miR-155-5p阻害によるHIF-1 α の発現を検討した。OGD-PBMCでは、miR-155-5pに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投

与での阻害にて，コントロールアンチセンスオリゴヌクレオチド投与に比して，HIF-1 α の発現が3倍に増加した(P<0.05)(図4A)．また，VEGFの発現も1.36倍に増加した(P<0.05)(図4B)．一方，Normoxic-PBMCではmiR-155-5p阻害にてHIF-1 α の発現は検出されなかった(図4C)．

考察

本論文では，OGD-PBMC投与により，脳梗塞周囲組織のミクログリアのVEGF発現が，局所のOGD-PBMCの消失後も持続すること，さらに，OGD-PBMC由来のエクソソーム中でmiR-155-5pが低下すること，OGD-PBMCではmiR-155-5pの阻害により，HIF-1 α の発現とVEGFの分泌が亢進することを示した．この結果からOGD刺激による保護効果発現にエクソソーム由来のmiR-155-5pの減少が関与している可能性を示した．

miR-155 は , HIF-1 α mRNA の 3' -UTR に結合し , HIF-1 α の発現を抑制する¹²⁾. また , miR-155-5p の低下は , ミクログリアや幹細胞における , VEGF の増加を伴う組織保護的な極性変化にも関与する¹²⁾¹⁴⁾¹⁹⁾²¹⁾. さらに , がん細胞でも , 虚血時に miR-155-5p の低下 , HIF-1 α の活性化により , 血管新生が起きるとされる²²⁾. 脳虚血時では , 脳梗塞モデルマウスへの miR-155-5p 阻害剤投与により , 血管新生が促され , 症状の改善を来す¹⁹⁾. 今回の結果は , これらの既報に一致する . これらより , OGD-PBMC の虚血脳組織保護効果の分子機序の一つとして , miR-155-5p-HIF-1 α -VEGF 系の関与があると考えた .

一方 , 何故 , OGD 刺激によって , miR-155-5p が減少するのかは , 明確ではない . 高血糖では , NF- κ B , AP-1 , STAT3 を介して , miR-155-5p は増加する²³⁾. このことは , miR-155-5p が血糖依存性に変化する可能性を示唆する . また , 抗炎症性物質である IL-10

は転写因子 Ets2 の阻害を介し miR-155 の発現を抑制する²⁴⁾。今後、OGD 刺激でもこれらの因子の関与を検討する必要がある。

また Normoxic-PBMC では miR-155-5p の阻害により HIF-1 α の発現増加は認めなかった (図 4C)。このことから miR-155-5p を介した HIF-1 α の発現増加には低酸素低糖条件が必要と考える。また、低酸素条件下での HIF-1 α の増加は一過性とされる²⁵⁾。低酸素低糖条件下での miR-155-5p 低下による HIF-1 α の発現と、その維持には、また別の機構が存在する事を示唆する。この機構は、miR-155-5p 低下による HIF-1 α の発現誘導の障害部位への選択性と、時間的制御に関係している可能性がある。今後、この分子機構の解明が期待される。

投与した OGD-PBMC は脳内に長期生着しなかった (図 1A)。一方、ミクログリアでの VEGF 発現は増加し、かつ継続した (図 1B)。このことから、OGD-PBMC からミクログリア

に情報が伝達され，それがミクログリアで継続していると想定した．今回の私の研究では，OGD-PBMC由来のエクソソームが，ミクログリアに影響した可能性を示唆する．今後，OGD-PBMC由来のエクソソーム投与でPBMCやミクログリアでの極性変化が誘導されるか，さらに何故，それが持続するのか，極性が変化したミクログリア由来のエクソソームの検討を行う必要がある．

本研究の限界として次の点を挙げる．まずOGD-PBMC由来のエクソソームが，直接ミクログリアに影響したことを検証していない．次にmiRNAの定量を，定量PCR等の方法で検証していない．さらに，エクソソーム中の他のmiRNAの影響を検証していないことが挙げられる．これらを解決するために，OGD-PBMC由来のエクソソームの投与によってミクログリアの極性変化が誘導されるか，また局所のmiR-155-5pの制御のみで，保護

効果を示すことができるかを検証することが必要である。

結論

脳梗塞に対して組織保護効果をもつ OGD 刺激後 PBMC では，エクソソーム中の miR-155-5p の減少を認めた。miR-155-5p の減少は転写因子 HIF-1 α 発現を増加させ，VEGF の分泌を増加させる。さらに，OGD-PBMC の神経保護効果の分子機序として，エクソソームを介した miR-155-5p-HIF-1 α -VEGF の系を見出した。

謝辞

本研究全般にわたり，ご指導ご助言をいただきました，新潟大学脳研究所脳神経内科 小野寺理教授，金澤雅人准教授，二宮格特任助教，金山武史先生，秋山夏葵先生，新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター臨床機能脳神経学分野 畠山公大助教，岐阜大学大学院脳

神経内科 下畑享良教授，医療イノベーション
推進センター 尾前薫先生，ラーニングヘルス
ソサエティー 福島雅典先生に深謝申し上げます。

図 1 OGD-PBMC と脳内ミクログリアの細胞間相互作用

A) 脳梗塞 7 日後のラットに OGD-PBMC を投与し, 脳梗塞 10 日後 (細胞投与 3 日後), 28 日後 (細胞投与 21 日後) に抗 STEM121 抗体を用いて免疫染色を行った。

投与 3 日後には STEM121 陽性細胞が認められたが, 投与 21 日後には STEM121 陽性細胞は認められなかった。

STEM121 : ヒト細胞のマーカー

B) 脳梗塞 7 日後のラットにリン酸緩衝液または OGD-PBMC を投与し, 脳梗塞 28 日後 (細胞投与 21 日後) に抗 VEGF 抗体, 抗 TMEM119 抗体を用いて免疫染色を行った。

VEGF 陽性かつ TMEM119 陽性細胞の数はリン酸緩衝液投与群と比べて, OGD-PBMC 投与群で有意に増加していた (* $P < 0.05$)。

TMEM119 : ミクログリアのマーカー

図 2 OGD-PBMC から分泌されるエクソソーム

A) OGD-PBMC 培地を ExoQuick 処理したのちの回収物を透過型電子顕微鏡を用いて撮像し, 70nm 大の小胞を確認した.

B) Normoxic 条件下と OGD 条件下の培地を ExoQuick 処理したのちの回収物における, 細胞外小胞マーカー CD9 に対するウェスタンブロッティング.

ExoQuick 処理後の回収物は, Normoxic 条件, OGD 条件ともに CD9 の発現を認め, トランスフェリンの発現は認めなかった (N=3).

図 3 低酸素低糖刺激 (OGD) を受けた末梢血単核球 (PBMC) の保護的極性の獲得

A) 通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC) と 18 時間 OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) の条件培地に対する VEGF のルミネクサッセイ.

VEGF は OGD-PBMC では Normoxic-PBMC に対して，有意に高値であった (** $P < 0.01$) ($N = 4$) .

B) Normoxic-PBMC (Norm) と OGD-PBMC (OGD) における HIF-1 α に対するウエスタンブロット .

HIF-1 α は Normoxic-PBMC では検出されなかったが，OGD-PBMC では検出された ($N = 3$) .

図 4 miR-155-5p 阻害による VEGF, HIF-1 α の発現効果

A) OGD 条件下で miR-155-5p 阻害剤を加えた PBMC 培養細胞溶解物の HIF-1 α に対するウエスタンブロッティング .

β -アクチンに対する HIF-1 α のデンシトメトリの結果から，miR-155-5p 阻害によって HIF-1 α が有意に増加していた (* $P < 0.05$) ($N = 5$) .

- B) miR-155-5p 阻 害 を 行 っ た Normoxic-PBMC, OGD-PBMC の 条 件 培 地 の ル ミ ネ ッ ク ス ア ッ セ イ .
- miR-155-5p 阻 害 を 行 っ た 条 件 培 地 (O G D - P B M C / N o r m o x i c - P B M C) の V E G F 分 泌 の 相 対 比 は コ ン ト ロ ー ル と 比 べ て 有 意 に 高 値 で あ っ た (* P < 0 . 0 5) (N = 3) .
- C) 通 常 条 件 下 で miR-155-5p 阻 害 剤 を 加 え た P B M C 培 養 細 胞 溶 解 物 の H I F - 1 α に 対 す る ウ エ ス タ ン ブ ロ ッ テ ィ ン グ .
- 対 照 の O G D - P B M C で は H I F - 1 α の 発 現 を 認 め た が , N o r m o x i c - P B M C で は miR-155-5p の 阻 害 剤 添 加 と c o n t r o l の い ず れ に お い て も H I F - 1 α の 発 現 を 認 め な っ た .

表 1 Normoxic-PBMC に対する OGD-PBMC の miRNA 発現

表 に 示 す も の は H I F - 1 α ま た は V E G F 増 加 に 関 わ る miRNA .

OGD-PBMC では miR-155-5p の発現が減少していた (**P=0.01) (N=3). その他の miRNA では有意な差は認めなかった.

参 考 文 献

1. Gorelick PB: The global burden of stroke: persistent and disabling. *Lancet Neurol* 18: 417-418, 2019.
2. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CB LM, Lugt A, Miquel MA, Donnan GA, Roos YB WEM, Bonafe A, Jahan R, Diener HC, Berg LA, Levy EI, Berkhemer OA, Pereira VM, Rempel J, Millán M, Davis SM, Roy D, Thornton J, Román LS, Ribó M, Beumer D, Stouch B, Brown S, Campbell BC V, Oostenbrugge RJ, Saver JL, Hill MD and Jovin TG: HERMES collaborators. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 387: 1723-1731, 2016.

3. Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, Fan X, Jiang Y, Stetler RA, Liu G and Chen J: Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. *Prog Neurobiol* 115: 92-115, 2014.
4. Park YJ, Niizuma Kuniyasu, Mokin M, Dezawa M and Borlongan CV: Cell-Based Therapy for Stroke: Musing With Muse Cells. *Stroke* 51: 2854-2862, 2020.
5. Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, Onodera O, Shimohata T and Zoppo GJD: Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab* 39: 753-769, 2019.
6. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JK, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V and

Kehrl JH: Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4167-4171, 1986.

7. Jin K, Mao XO and Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. J Neurobiol 66: 236-242, 2006.
8. Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F and Ehlers MD: TGF-beta signaling specifies axons during brain development. Cell 142: 144-157, 2010.
9. Hatakeyama M, Ninomiya I and Kanazawa M: Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic

- stroke. *Neural Regen Res* 15: 16-19, 2020.
10. Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, Omae K, Kimura Y, Takahashi T, Onodera O, Fukushima M and Shimohata T: A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep* 9: 16819, 2019.
11. Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M and Shimohata T: Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 7: 42582, 2017.
12. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC,

Simpson DA, Leonard MO, Tambuwala MM, Cummins EP and Taylor CT: MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol* 31: 4087-4096, 2011.

13. Zhang L, Wei W, Ai X, Kilic E, Hermann DM, Venkataramani V, Bähr M and Doeppner TR: Extracellular vesicles from hypoxia-preconditioned microglia promote angiogenesis and repress apoptosis in stroke mice via the TGF- β /Smad2/3 pathway. *Cell Death Dis* 12: 1068, 2021.

14. Zhang ZG, Buller B and Chopp M: Exosomes-beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury. *Nat Rev Neurol* 15: 193-203, 2019.

15. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ and Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 6: 654-659, 2007
16. Debrowska S, Andrzejewska A, Strzemecki D, Muraca M, Janowski M and Lukomska B: Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate neuroinflammation evoked by focal brain injury in rats. *J Neuroinflamm* 16: 216, 2019.
17. Dong P, Li Q and Han H: HIF-1 α in cerebral ischemia (Review). *Mol Med Rep* 25: 41, 2022.
18. Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M,

Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T and Würbel H: The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *J Cereb Blood Flow Metab* 40: 1769-1777, 2020.

19. Caballero-Garrido E, Pena-Philippides JC, Lordkipanidze T, Bragin D, Yang Y, Erhardt EB and Roitbak T: In Vivo Inhibition of miR-155 Promotes Recovery after Experimental Mouse Stroke. *J Neurosci* 35: 12446-12464, 2015.

20. Alique M, Bodega G, Giannarelli C, Carracedo J and Ramírez R: MicroRNA-126 regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α which

inhibited migration, proliferation, and angiogenesis in replicative endothelial senescence. *Sci Rep* 9: 7381, 2019.

21. Pena-Philippides JC, Caballero-Garrido E, Lordkipanidze T and Roitbak T: In vivo inhibition of miR-155 significantly alters post-stroke inflammatory response. *J Neuroinflammation* 13: 287, 2016.

22. Wang J, Zou Y, Du B, Li W, Yu G, Li L, Zhou L, Gu X, Song S, Li Y, Zhou W, Xu B and Wang Z: SNP-mediated lncRNA-ENTPD3-AS1 upregulation suppresses renal cell carcinoma via miR-155/HIF-1 α signaling. *Cell Death Dis* 12: 672, 2021.

23. Jankauskas SS, Gambardella J, Sardu C, Lombardi A and Santulli G: Functional Role of miR-155 in the

Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. Noncoding RNA 7: 39, 2021.

24. Quinn SR, Mangan NE, Caffrey BE, Gantier MP, Williams BRG, Hertzog PJ, McCoy CE and O'Neill AJ: The role of Ets2 transcription factor in the induction of microRNA-155 (miR-155) by lipopolysaccharide and its targeting by interleukin-10. J Biol Chem 289: 4316-4325, 2014.

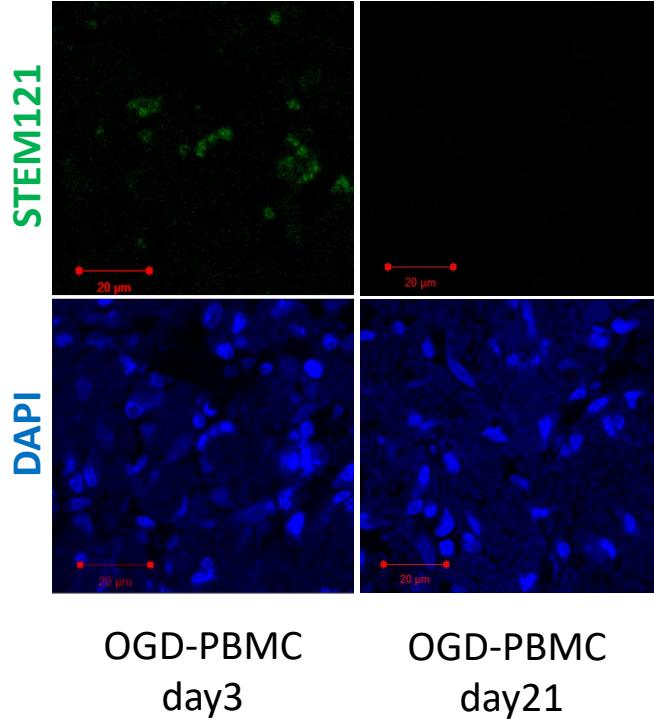
25. Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J and Berra E: PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. Proc Natl Acad Sci. U S A 105: 4745-4750, 2008.

新潟医学会雑誌 函

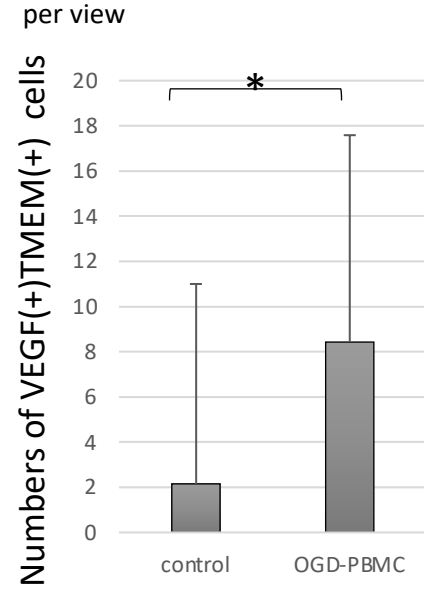
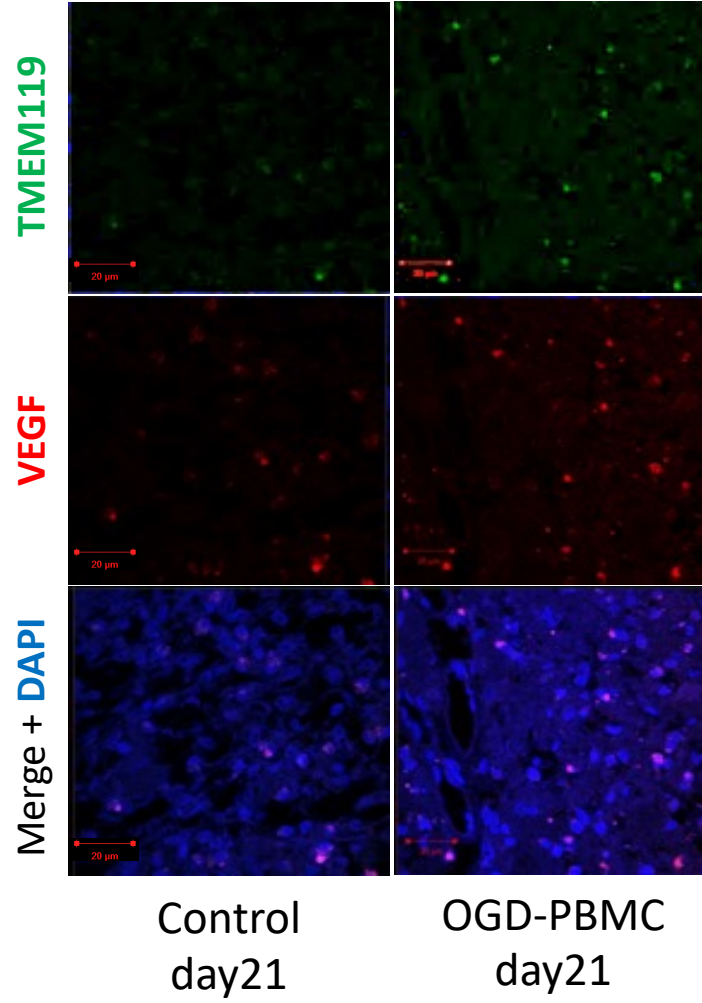
2023/1/19

脳神経内科 大津裕

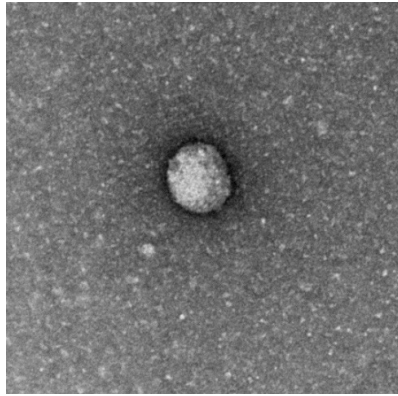
A



B

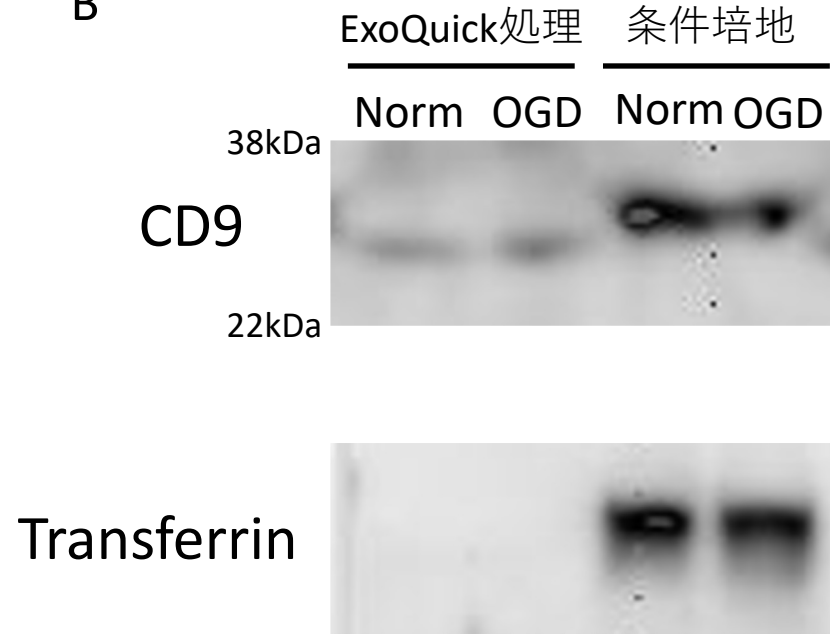


A

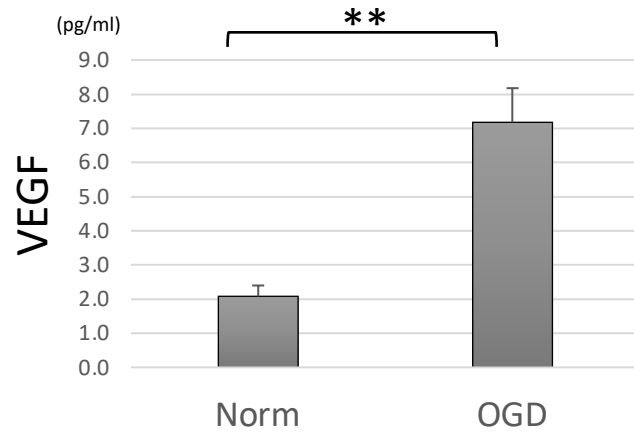


OGD 200 nm

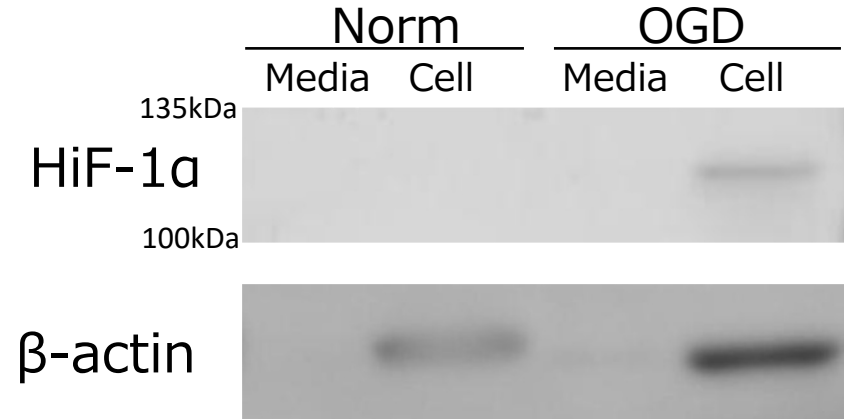
B



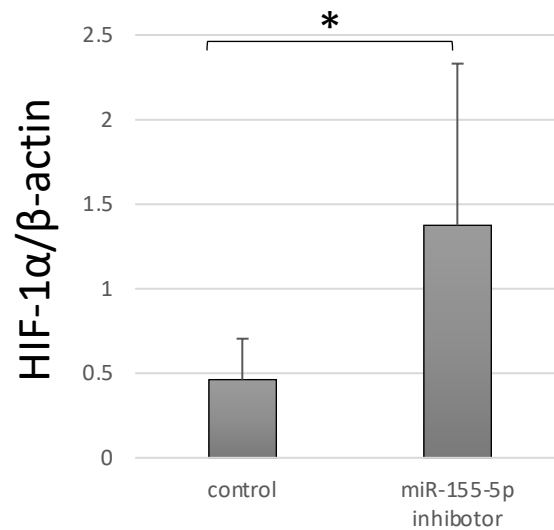
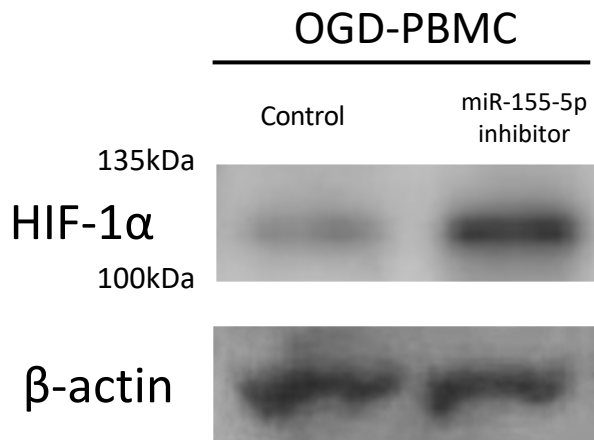
A



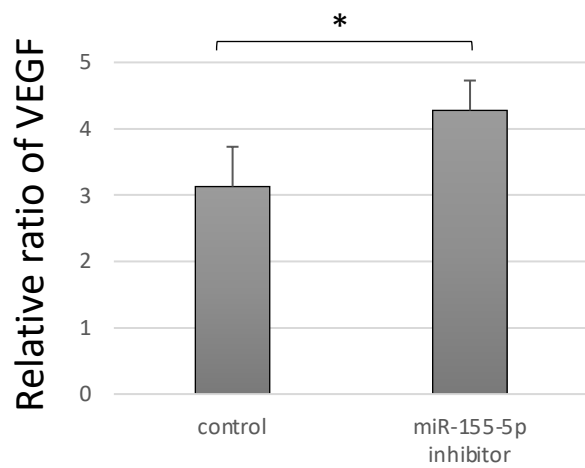
B



A



B



C

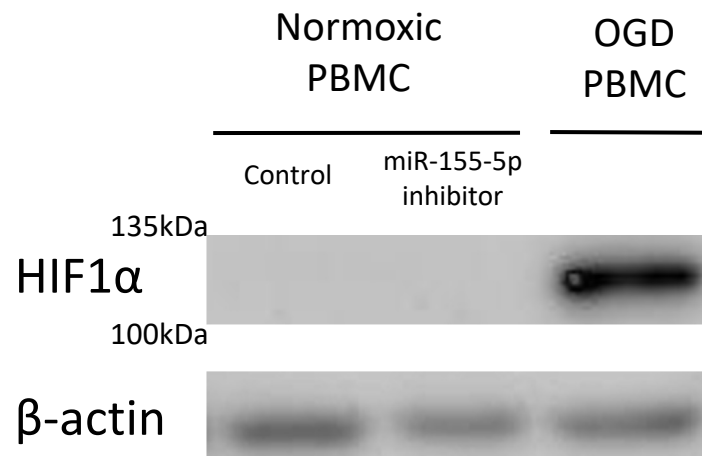


表1

miRNA	OGD/normoxia ratio
miR-433-3p	0.60
-5p	1.98
miR-335-3p	1.22
-5p	1.94
miR-210-3p	1.88
-5p	0.86
miR-155-3p	0.95
-5p	0.37 **
miR126-3p	0.71
-5p	1.05