

令和元年5月9日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15340

研究課題名(和文) 標的細胞特異的エクソソームを用いたRNA配送システムによる神経障害性疼痛治療

研究課題名(英文) Development of RNA medicine delivery system with target-specific exosomes for the treatment of neuropathic pain

研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI, HIDENORI)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：30221328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ほぼ全ての細胞が分泌する膜性小胞であるエクソソームが、標的細胞へ取り込まれて内包するRNA分子を運搬する性質に着目し、一次感覚神経に選択的にmicroRNA(miRNA)の関連分子を作用させることによる神経障害性疼痛の新しい治療法の基盤形成を目指した。変形性関節症モデルを用いて疼痛に伴って関節液に分泌されると予測される複数のmiRNAを同定した。このうちmiR-21が一部の一次感覚神経細胞に存在するToll-like receptor (TLR) 7に作用し、疼痛を惹起する可能性が明らかとなった。従って、miR-21を阻害する核酸医薬は疼痛の新規治療薬となりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん、糖尿病あるいは外傷など様々な疾患に起因する難治性神経障害性疼痛に対する疼痛管理は、現在の医療において患者のQOLを改善するために重要な課題の1つである。現在使用されている抗てんかん薬、抗うつ薬やオピオイド等の鎮痛薬は効果が限定的であり、有害反応も少なくない。さらに、これらの治療薬は本疾患の病態に基づく合理的かつ特異的な治療手段となり得ていない。本研究の成果は、病態生理に基づき、miRNA関連分子による新たな神経障害性疼痛に対する治療薬の開発基盤を提供する点で、学術的・社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular vesicles containing RNAs and proteins, and play a role in cell-to-cell communication. Therefore, they can work as a target-specific drug delivery system for RNA medicine. MicroRNA (miRNA) post-transcriptionally regulates the expression of many specific genes. In this study, we searched for potential miRNAs present in exosomes as candidates to develop novel drugs for the treatment of neuropathic pain. In knee osteoarthritis (OA) model rats with neuropathic pain, we found that the miRNA miR-21 was released from the synovial tissue and increased in the synovial fluid in OA model rats. A single intra-articular injection of miR-21 inhibitor (modified RNAs) exerted long-term analgesia in OA rats, while miR-21 injection caused knee joint pain through Toll-like receptor 7, which was expressed in the primary afferent neurons in naive rats. These results suggest that miR-21-blocking nucleic acids have a clinical potential against OA with neuropathic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：変形性膝関節症 核酸医薬 マイクロRNA 神経障害性疼痛 一次感覚神経 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

難治性神経障害性疼痛に対する疼痛管理は、患者のQOLを改善するために重要な課題の1つである。現在使用されている抗てんかん薬、抗うつ薬やオピオイド等の鎮痛薬は、効果が限定的であり、有害反応も少なくない。さらに、これらの治療薬は本疾患の病態に基づく合理的かつ特異的な治療手段となり得ていない。一方、疾患病態モデル動物を用いた解析から、様々な新規治療法の可能性が見いだされてきている。従って、こうした新知見に依拠し神経障害性疼痛の病態に基づいた特異的治療手段の開発が望まれている。神経障害性疼痛において、タンパク質をコードしない非翻訳RNA(ncRNA)の1種であるmicroRNA(miRNA)が病態に関与することが示されている(Sakai & Suzuki, 2014)。我々は神経障害性疼痛モデルにおいて、一次感覚神経のmiR-7aが低下し、標的であるNa⁺チャンネルサブユニットの発現を上昇させ、一次感覚神経の興奮性を亢進することを見いだした(Sakai et al., 2013)。さらに、miR-7aをアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて一次感覚神経に遺伝子導入することにより疼痛を緩和することも世界に先駆けて報告した。すなわちncRNAは新しい治療薬候補となり得るが、実用化には核酸を運ぶ安全で特異性の高い薬物輸送システム(DDS)が必要とされる。

近年、核酸やタンパク質を含有する膜性の小胞であるエクソソームが細胞外へと分泌され、エクソソームの細胞内への取り込みや細胞膜への融合により内容物が細胞内へ放出されることが明らかにされてきている。エクソソームは体内において高い安定性を有しており、効率よく取り込まれることから、新たなDDSとしての可能性が考えられるが、報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、一次感覚神経細胞において神経障害性疼痛で変動するmiRNAを同定し、関連分子を一次感覚神経に選択的に導入可能なエクソソームの作製を試み、核酸医薬のDDSとしての実現可能性を検討することを目的とした。これらの研究を通して、多くの標的分子をまとめて制御可能なmiRNA関連分子を基にした、神経障害性疼痛に対する新たな治療薬の開発基盤を提供する。

3. 研究の方法

1) エクソソームの回収と同定

エクソソーム産生細胞としてHEK培養細胞あるいは一次感覚神経の初代培養細胞を用いてExoQuick-TC(System Biosciences社)もしくはTotal Exosome Isolation Reagent(Thermo Fisher Scientific社)によりエクソソームを回収した。エクソソーム膜に豊富に存在する複数の分子をwestern blotやELISAを用いて確認した。

2) エクソソームに搭載する候補核酸分子の対象としての神経障害性疼痛時に変動するmiRNAの同定

第5腰椎脊髄神経結紮により神経障害性疼痛を発症したラットを用いて、一次感覚神経の細胞体が存在する後根神経節においてmiRNAマイクロアレイおよびRNA sequenceを行い、変動するmiRNAのスクリーニングを行った。スクリーニングで得られた個々のmiRNAについて、定量的PCRで変動を確認した後、miRNAに対するアンチセンスRNAあるいはmiRNAをウイルスベクターにより個体の後根神経節細胞に導入して、実際にこれらのmiRNAが神経障害性疼痛に関与するかを検討した。

3) 一次感覚神経指向性を有した改変エクソソームの構築に向けたmiRNAの同定

細胞外へ分泌されて一次感覚神経細胞に作用するmiRNAの同定を試みた。核酸医薬の臨床応用を想定した場合、関節腔は限られた空間であり、適当な投与部位となり得る。膝関節における前十字靭帯の断裂は、ヒトにおいて難治性の疼痛を伴う変形性膝関節症を誘引する一因であり、ラットにおいても前十字靭帯の

切断は疼痛や関節軟骨の菲薄化を惹起し、変形性膝関節症モデルとして知られている。そこで、本モデル動物の膝関節滑膜において miRNA マイクロアレイを行い、偽手術群に比べ上昇する miRNA をスクリーニングした。これらの miRNA が実際に細胞外に放出されるかを関節液中の含有量を測定することで確認した。候補 miRNA およびその阻害核酸を用いて、疼痛発症・維持に関与するかを変形性膝関節症モデルにおいて検討した。

4) ヒト化エクソソームによるヒト一次感覚神経への作用の検討

ヒトへの応用を検討するにあたり、ヒト iPS 細胞から一次感覚神経細胞への分化を検討し、分化誘導法を確立した。分化したヒト一次感覚神経細胞において、ラット後根神経節培養細胞から放出されたエクソソームで検出された miRNA と比較検討した。

4. 研究成果

1) エクソソームに搭載する候補核酸分子の対象としての神経障害性疼痛時に変動する miRNA の同定

第5腰椎脊髄神経結紮により神経障害性疼痛を発症したラットを用いて、一次感覚神経の細胞体が存在する後根神経節において miRNA および RNA sequence を行い、変動する miRNA のスクリーニングを行った。その中で、6種の miRNA からなる miR-17-92 クラスターが長期的に発現上昇することを見出した。特に miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-92a の4種の miRNA によりそれぞれ疼痛が惹起された。個々の miRNA に対するアンチセンス RNA をウイルスベクターにより導入して機能阻害を行ったところ、神経障害性疼痛が長期的に緩和されることが明らかになった。さらにこれらの miRNA は協働してカリウムチャネル発現を調節し、細胞の興奮性を高めていることが明らかとなった。

2) 一次感覚神経指向性を有した改変エクソソームの構築に向けた miRNA の同定

変形性関節症において滑膜炎が疼痛と良く相関することから、前十字靭帯切断 (ACLT) による変形性膝関節症モデルラットを用いて滑膜組織における microRNA の発現変化をマイクロアレイにより網羅的に解析し、miR-21 が最も大きく発現上昇することを見出した。また、miR-21 は実際に関節液中でも増加し、滑膜細胞からエクソソームに含有されて細胞外へ放出されることが確認された。健常ラットの膝関節腔内に miR-21 を投与することにより、疼痛閾値の低下が認められ、モデル動物で miR-21 inhibitor を投与すると長期的な疼痛の改善が認められた。細胞外の miR-21 は Toll-like receptor (TLR) 7 を活性化することが報告されているため、健常ラットの膝関節腔内に TLR7-9 阻害薬を投与したところ miR-21 による痛覚過敏を緩和することができた。TLR7 は関節を神経支配する一次感覚神経細胞の一部に発現していることが明らかになった。以上の結果から、細胞外の miR-21 関連分子が一次感覚神経指向性を有したエクソソームに搭載される分子候補となり得ることが示唆された。

3) ヒト化エクソソームによるヒト一次感覚神経への作用の検討

ヒト iPS 細胞から一次感覚神経細胞への分化を検討し、分化誘導法を確立した。分化したヒト一次感覚神経細胞において、ラット後根神経節培養細胞から放出されたエクソソームで検出された miRNA の一部が、エクソソームから検出できた。以上より、本実験系は、動物モデル実験で得られた、神経障害性疼痛の miRNA 関連分子を標的としたエクソソーム系のヒトへの外挿に関して、適切であろうと考えられる。

4) エクソソームの回収と同定

HEK 培養細胞あるいは一次感覚神経細胞を用いて ExoQuick-TC (System Biosciences 社) 及び Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) によりエクソソームを回収したが、主要な

膜タンパク分子は western blot で確認できなかった。ELISA 法を用いてエクソソームは回収できていることが確認できた。従って、細胞特異的エクソソームタンパク質を同定する方法を変更し、現在質量分析法による同定と絞り込みを検討中である。

引用文献

Sakai A, Suzuki H. Emerging roles of microRNAs in chronic pain. *Neurochem Int.* 77; 58-67, 2014. DOI: 10.1016/j.neuint.2014.05.010.

Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain.* 136: 2738-2750, 2013. DOI: 10.1093/brain/awt191.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

鈴木秀典 神経障害性疼痛と非コード RNA 痛みと漢方 査読有 Vol. 28, p16-21, 2018.

坂井 敦、鈴木秀典 microRNA クラスター miR-17-92 による神経障害性疼痛の制御 生化学 査読有 第 90 巻第 4 号、pp524-528, 2018. DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900524

Sakai A, Saitow F, Maruyama M, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Okada T, Suzuki H. MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain. *Nat Commun*, 査読有 8: 16079, 2017. DOI: 10.1038/ncomms16079.

Ito N, Sakai A, Miyake N, Maruyama M, Iwasaki H, Miyake K, Okada T, Sakamoto A, Suzuki H. miR-15b mediates oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain through BACE1 down-regulation. *Br J Pharmacol*, 査読有 174: 386-395, 2017. DOI: 10.1111/bph.13698.

〔学会発表〕(計 19 件)

Sakai Atsushi, Saitow Fumihito, Maruyama Motoyo, Miyake Noriko, Miyake Koichi, Okada Takashi, Suzuki Hidenori. Role of miR-17-92 in the functional changes of primary sensory neurons following nerve injury. 第 91 回日本薬理学会年会 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議 2018.

Maruyama Motoyo, Sakai Atsushi, Okada Takashi, Suzuki Hidenori. Involvement of the long non-coding RNA Neat1 in the neuropathic pain and neurite outgrowth following nerve injury. 第 91 回日本薬理学会年会 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議 2018.

坂井 敦、丸山基世、岡田尚巳、鈴木秀典. 神経障害性疼痛モデルラットの一次感覚神経における Neat1 長鎖非コード RNA の解析. 第 40 回日本疼痛学会 2018.

星川直哉、坂井 敦、高井信朗、鈴木秀典. 変形性膝関節症モデルラットにおいて miR-21 は Toll-like receptor を介して疼痛に関与する. 第 40 回日本疼痛学会 2018.

丸山基世、坂井 敦、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典．神経障害性疼痛及び軸索再生に対する Neat1 の関与．第 20 回日本 RNA 学会年会 2018．

星川直哉、坂井 敦、鈴木秀典、高井信朗．miR-21 を標的とした変形性関節症に伴う疼痛治療の可能性．第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 2018．

坂井 敦、丸山基世、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典．神経障害性疼痛における長鎖非コード RNA Neat1 の作動機構の探索．生理学研究所 研究会「生体サバイバル戦略としての痛みの機構と意義」 2018．

鈴木秀典．疼痛と非コード RNA．第 30 回日本疼痛漢方研究会学術集会 2017．

鈴木秀典、坂井 敦．末梢神経障害と変動する miRNA：リキッドバイオプシーによる痛みのバイオマーカーへの可能性．第 37 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム 2017．

坂井 敦、丸山基世、岩崎宏俊、鈴木秀典．後根神経節に高発現する長鎖非コード RNA の神経障害性疼痛における変化．第 39 回日本疼痛学会 2017．

坂井 敦、齋藤文仁、丸山基世、三宅紀子、三宅弘一、岡田尚巳、鈴木秀典．miR-17-92 クラスタは感覚神経の神経損傷において電位依存性カリウムチャネル機能を調節する．Conbio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会 第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 2017．

丸山基世、坂井 敦、岩崎宏俊、鈴木秀典．神経傷害による長鎖非コード RNA の発現変化．Conbio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会 第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 2017．

坂井 敦．末梢神経傷害に伴う一次感覚神経機能変化における miR-17-92 の役割．生理学研究所研究会「痛みを中心とする有害状況適応の神経戦略バイオロジー」2017．

丸山基世、坂井 敦、鈴木秀典．神経障害性疼痛における長鎖ノンコーディング RNA の発現解析．第 90 回日本薬理学会年会 2017．

Sakai Atsushi, Ito-Kuroki Naomi, Maruyama Motoyo, Miyake Noriko, Iwasaki Hirotohi, Miyake Koichi, Okada Takashi, Sakamoto Atsuhiro, Suzuki Hidenori．miR-15b role in the oxaliplatin-induced neuropathic pain. 16th World Congress on Pain. 2016.

黒木直美、坂井 敦、三宅紀子、三宅弘一、岡田尚巳、鈴木秀典、坂本篤裕．一次感覚神経節 miR-15b のオキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛における解析．第 63 回日本麻酔科学会 2016．

坂井 敦、丸山基世、三宅紀子、齋藤文仁、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典．神経障害性疼痛における miR-17-92 クラスタによるカリウムチャネルの調節．第 38 回日本疼痛学会 2016．

Sakai Atsushi, Miyake Noriko, Maruyama Motoyo, Miyake Koichi, Shimada Takashi, Okada Takashi, Suzuki Hidenori. Voltage-gated potassium channel modulation by miR-17-92 cluster in the neuropathic pain. 第 39 回日本神経科学大会 2016.

坂井 敦、丸山基世、鈴木秀典. 感覚神経傷害による miR-21 の細胞外放出の上昇. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: microRNA-21 を標的とした変形性関節症による疼痛の緩和

発明者: 星川直哉、坂井 敦、鈴木秀典、高井信朗

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2019/009867

出願年: 2019 年

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/nms-pharmacol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 坂井 敦

ローマ字氏名: SAKAI ATSUSHI

所属研究機関名: 日本医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 30386156