

令和元年6月12日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18298

研究課題名(和文)エクソソーム二重膜上に存在する疼痛増悪因子の同定と新しい疼痛治療戦略の創出

研究課題名(英文) Identification of pain aggravating factors on the surface protein of exosomes, and creation of new pain treatment strategies

研究代表者

濱村 賢吾 (HAMAMURA, Kengo)

第一薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30756466

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)：エクソソームは血液などの体液に含まれる直径40-150 nmの脂質二重膜の小胞である。近年、疼痛時の血中エクソソームに存在する物質が、疼痛強度の指標となることが示唆されている。しかし、エクソソームと疼痛強度の増強との関連性は不明であった。我々は、神経障害性疼痛モデルの坐骨神経部分結紮マウス血清由来のエクソソーム二重膜上のタンパク質が低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動を増強することを明らかにした。現在、エクソソーム二重膜上の膜タンパク質の同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム研究は、がんの診断マーカーの探索やドラッグデリバリーシステム(DDS)の領域で盛んに行われている。本研究では、初めてエクソソームと神経障害性疼痛の病態悪化とを関連付けた。また、従来までのエクソソーム研究がバイオマーカーの探索等で着目されたエクソソームの内腔に主眼を置いた研究であるのに対し、本研究におけるアプローチは膜外領域である二重膜上の膜タンパク質に着目している点で大きく異なる。エクソソームと病態進行との関連性に焦点を当てることで、病態の解明や創薬、さらには老化や疾患の予防といった健康増進を指向した応用研究への移行にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small (40-150 nm) membrane vesicles of endocytic origin that are found in body fluids, and supporting their role in intercellular communication. Although recent studies have demonstrated that various biomarkers involved in the extent of pain from the serum exosomes, the effects of exosomes on the progression of pain have not been elucidated. We have confirmed that 0.5% formalin-induced nociceptive response was significantly enhanced by intrathecal (i.t.) pretreatment with serum exosomes isolated from partial sciatic nerve ligation (PSL) mice but not from sham mice. In addition, we digested the exosomes isolated from PSL with trypsin to obtain the 'surface protein shaved' exosomes. The surface protein shaved PSL exosomes were ineffective on formalin-induced response. Currently, we are trying to identify membrane proteins on exosomes isolated from PSL.

研究分野：疼痛学

キーワード：エクソソーム 神経障害性疼痛 ホルマリン誘発侵害刺激行動

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛とは、神経細胞の損傷が原因となって起こる難治性の慢性疼痛である。鎮痛薬として、麻薬性鎮痛薬であるモルヒネなどが従来から使用されているが、治療抵抗性を示すことが多い。したがって、効率的な新薬の開発や治療法の確立が望まれている。

(2) エクソソームは生体内の細胞および培養細胞から分泌される直径 40-150nm の脂質二重膜の小胞である。エクソソームは血液だけでなく尿、母乳といった体液中に存在することが特徴であり、体液を介し全身の細胞に分布することが知られている。

従来、エクソソームは『細胞中のゴミのはき出し場』と考えられ研究対象となることはなかった。ところが近年、①エクソソーム中に封入されている物質は血液中より安定であること、

②血液脳関門を通過し中枢-末梢間の移動ができること、および③細胞から分泌されるエクソソームの中に機能性タンパク質が封入されており、細胞間コミュニケーションに利用されていること (Valadi H, *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2007) が相次いで報告された。

(3) 現在のエクソソーム研究は、がんや免疫系疾患などの病態と関連付け主に 2 つの領域で盛んに行われている。1 つは、血液のエクソソーム中に含まれる miRNA に着目したがんの診断マーカーの探索、もう 1 つはエクソソームの中に薬物を封入させ投与することで、標的臓器への移行性を高めるドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用である。

このようにエクソソームを利用した研究は行われているが、エクソソームの本体またはエクソソーム中に封入されている因子の生理学的意義や、病態の発症・進行過程に与える影響は解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation: PSL) マウス血清由来エクソソームを用いて、PSL マウスの疼痛発症、および低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動に及ぼす影響を偽手術 (Sham) 群と比較検討した。さらに、侵害刺激行動に影響を与える因子の同定を試みた。

最終的に、エクソソームに存在する疼痛強度に影響を与える因子を排除することで痛みを抑制できるという新規治療標的の確立をし、患者の生活の質改善に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

(1) PSL マウスは、5 週齢の ddY マウスをイソフルラン麻酔下、右足の坐骨神経を露出させ、4-0 絹糸で坐骨神経を 1/2 程度部分結紮することで作製した。同様の操作で坐骨神経を露出し坐骨神経を結紮せずに傷口を縫合した Sham 群をコントロールとした。

(2) エクソソームは、PSL 作術後 7 日目に血清を採取し、濃縮用試薬である ExoQuick (システムバイオサイエンス社) を添加後、遠心 (1,500×g, 30min.) することによりエクソソームと上清とに粗精製した。粗精製したエクソソームは、サイズ排除クロマトグラフィーカラムである EVSecond L70 (ジーエルサイエンス社) にて精製を行った。

(3) 侵害刺激行動は、0.5%ホルマリン (20 μL) を正常マウスの右後脚足蹠内 (i. pl.) に投与し、投与後 5 分間までの投与部位に対する Licking (舐める)、Biting (噛む) 秒数を 30 秒ごとに算出することにより評価した。マウス血清由来のエクソソームは、ホルマリン i. pl 投与の直前に脊髄クモ膜下腔内 (i. t.) に投与した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの疼痛発症に関する検討として、PSL マウス血清由来のエクソソームを正常マウスに i. t. 投与を行ったが、下腿部位への Licking/Biting などの侵害刺激関連行動は認められなかった。つまり、エクソソームは疼痛発症には関与しないことを明らかとした。

(2) エクソソームの疼痛強度に関する検討では、PSL マウス血清由来のエクソソームを別個体の PSL マウスに i. t. 単回投与しても、疼痛強度には変化は見られなかった。これはエクソソームの血液中における半減期が 2-30 分と非常に短いために、単回投与では影響が反映されにくいと考えた。そこで、急性の炎症性疼痛モデルとして確立されているホルマリンを投与する実験系を設定した。

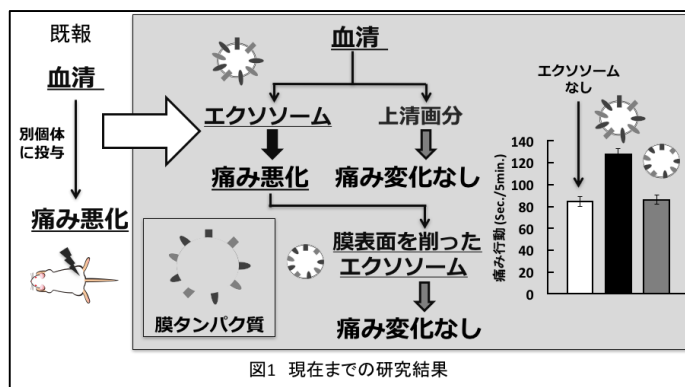
(3) 0.5%ホルマリン誘発侵害刺激行動の測定により、エクソソームが疼痛強度に与える影響の検討を行った。Sham 群血清由来のエクソソームを i. t. 投与直後にホルマリンを投与する群における侵害刺激行動は、媒体対照群と変わらなかった。一方で、PSL マウス血清由来のエクソソーム群では、Sham 群と比較して侵害刺激行動時間の延長を認めた。

(4) Sham および PSL マウス血清由来のエクソソームを試薬にて粗精製した際の遠心上清画分を i. t. 投与した群においても、侵害刺激行動は媒体対照群と変わらなかった。

(5) PSL マウス血清由来のエクソソーム二重膜上に発現する膜タンパク質をトリプシン消化にて削いだ PSL “shaved” エクソソーム群においては、侵害刺激行動の悪化が引き起こされないことを明らかにした。

以上より、エクソソームは侵害刺激行動の発症過程に関与しないこと、PSL マウス血清由来のエクソソーム二重膜上のタンパク質が、低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動を増強することを明らかにした(図1)。

現在、エクソソーム二重膜上のタンパク質のペプチドライブラリーを構築し、構築したライブラリーを用いて質量分析法にて解析することで、因子を同定している最中である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Hamaura Kengo, Katsuyama Soh, Komatsu Takaaki, Sakurada Tsukasa, Aritake Kosuke. Formalin-induced nociceptive response is enhanced by serum exosomes isolated from partial sciatic nerve ligation (PSL) mice. 第92回日本薬理学会年会, 2019年.
- ② 濱村 賢吾, 勝山 壮, 小松 生明, 櫻田 司, 有竹 浩介. マウス血清由来のエクソソームに着目した低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動の増強作用機序解明. 第17回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム2018, 2018年.
- ③ Hamamura Kengo, Katsuyama Soh, Toyofuku Yohei, Watanabe Shunpei, Nishimura Yuri, Sueishi Nanami, Tanaka Taisei, Komatsu Takaaki, Sakurada Tsukasa, Aritake Kosuke. Novel enhancement mechanisms of the nociceptive response by serum exosomes in a mouse model of neuropathic pain. WCP2018. 2018年.
- ④ 濱村 賢吾, 勝山 壮, 小松 生明, 櫻田 司, 有竹 浩介. マウス血清由来のエクソソームに着目した低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動の増強作用機序解明. 第13回トランスポーター研究会年会, 2018年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.daiichi-cps.ac.jp/kenkyu/lab08.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。