

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06795

研究課題名(和文)血清中エクソソームに着目した神経障害性疼痛の増悪機構解明と治療法への応用

研究課題名(英文) Novel enhancement mechanisms of the nociceptive response by serum exosomes in a mouse model of neuropathic pain

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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは体液に含まれる直径約40-150nmの脂質二重膜の小胞である。近年、疼痛時の血清から単離したエクソソーム中に存在する物質が、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発症および疼痛強度の増強との関連性は解明されていなかった。そこで本研究では、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮(PSL)マウスを用い、PSLマウス血清中エクソソームの侵害刺激行動に対する影響を検討した。その結果、現在までに我々はPSLマウス血清中エクソソーム二重膜上に存在する因子が脊髄侵害刺激シグナルを亢進させ、低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動を増強させることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small (40-150nm) membrane vesicles of endocytic origin that are found in blood and so on. Although various biomarkers in the serum exosomes are identified by recent studies, the influences of exosomes on pain are not elucidated. The objective of this study was to identify the relationship between serum exosomes in mice with partial sciatic nerve ligation (PSL) and alterations of nociceptive responses induced by formalin. First, we have confirmed that the intrathecal injection of serum exosomes in mice with PSL into the normal mice did not produce spontaneous nociceptive response. However, 0.5% formalin-induced nociceptive response was enhanced significantly by serum exosomes obtained from PSL mice. In addition, surface protein "shaved" exosomes were ineffective on formalin-induced response. Taken together, our data indicate that the surface protein of exosomes in mice with PSL may play an important role in enhancing formalin-induced nociceptive responses.

研究分野：薬理学

キーワード：エクソソーム 神経障害性疼痛 ホルマリン誘発性侵害刺激行動

### 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。現在、全世界で数千万人にものぼる人々が神経障害性疼痛に苦しんでいる。鎮痛薬として、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) やモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬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約 40-150 nm 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、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、および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<引用文献①> が相次いで報告された。

(3) 近年、神経障害性疼痛時において血清から単離したエクソソーム中に存在する物質が、疼痛強度の指標となることが示唆されている。しかし、エクソソームに関する研究はバイオマーカーの探索が主であるため、エクソソームに存在する因子が疼痛発症および疼痛強度の増強に与える影響は解明されていない。

### 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 (PSL) マウス血清由来エクソソームを用いて、PSL マウスの疼痛強度、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) 神経障害性疼痛モデルマウスは、PSL 法に従いマウス右足の坐骨神経を露出させ、坐骨神経を 1/2 程度結紮することで作成した。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、マウスの PSL 後 7 日目に血清を超遠心法によって分離・採取し実験に供した。

(3) PSL マウス血清由来のエクソソームは、脊髄クモ膜下腔内 (i. t.) へ投与し、直後に低濃度ホルマリン (0.5%) を正常マウスの右後脚足蹠内に投与した。0.5%ホルマリン投与 5 分後には投与部位に対する侵害刺激行動 (Licking/Biting) はほぼ消失したため、行動観察時間は 5 分間とした。

### 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の脊髄クモ膜下腔内 (i. t.) 投与を行ったが、下腿部位への Licking/Biting などの自発的疼痛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 マウスの 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 2-60 分と非常に短いため、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%ホルマリン誘発性侵害刺激行動に関する検討では、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、ホルマリン単独群と変わらないことが示唆された。一方で、PSL マウス血清由来のエクソソーム群は、Sham 群と比較して有意な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の超遠心血清画分とホルマリンを投与した群においても、侵害刺激行動はホルマリン単独群と変わらないことが示唆された。以上から、PSL マウス血清由来のエクソソームに存在する因子が低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動を増強しているものと推察された。

(5) 次にエクソソームの中身が重要なのか、二重膜表面が重要なのかを同定しようと試みた。今回我々は、二重膜上の膜タンパク質を削いだ、“Shaved exosome”を作成した。このエクソソームを用いた結果、PSL マウス血清由来のエクソソームにて侵害刺激行動が顕著に悪化した群と比較して、その膜上のタンパク質を削いだ“Shaved exosome”群では、侵害刺激行動の延長が引き起こされないことが示唆された。つまり、神経障害性疼痛モデルマウスの血清由来エクソソーム二重膜上に痛みを増強させる物質が存在していることが示唆された。(図 1)

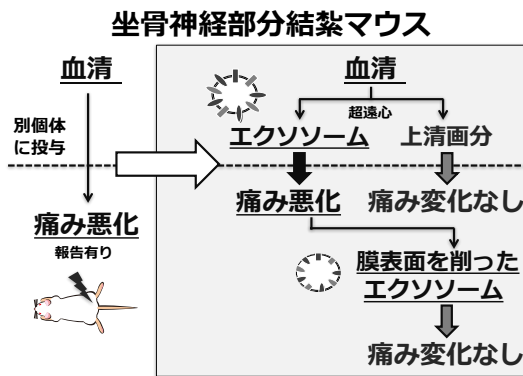


図1 現在までに得た研究成果

(6) 現状、エクソソーム二重膜上の膜タンパク質の同定には至っていない。これは、血清由来のエクソソームは全身の臓器から産生されたエクソソームを反映しており、障害を受けた神経細胞由来のエクソソームが占める割合が低く、発現量の差を検出できなかったためだと考える。この問題点に関して今後は、2つの方策にて解決を試みる。1つめは、障害を受けた神経細胞由来のエクソソームを多く含んでいると考えられる、マウスの脳脊髄液を回収し用いることである。2つめは、血清由来のエクソソームから臓器特異的なエクソソームを回収する手技を用いることである。具体的には、エクソソーム二重膜上に発現し、かつ臓器特異的に発現するタンパク質を免疫沈降法にて捕捉することで、障害を受けた神経細胞由来のエクソソームを分離することが可能であると考えられる。

(7) 今後は、疼痛強度を増強させるエクソソーム二重膜上の因子を同定し、最終的には、エクソソームの二重膜上に存在する疼痛強度増悪に関与する因子を排除することで痛みを緩和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す。

#### <引用文献>

① Valadi H *et al.*, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, Volume 9(6), 2007, pp. 654–659

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Mizoguchi H, Watanabe C, Hayashi T, Iwata Y, Watanabe H, Katsuyama S, Hamamura K, Sakurada T, Ohtsu H, Yanai K, Sakurada S.  
The involvement of spinal release of histamine on nociceptive behaviors induced by intrathecally administered

spermine.

*European Journal of Pharmacology*, 査読有, Volume 800, 2017, pp. 9–15  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.01.031.

- ② Matsunaga N, Ikeda E, Kakimoto K, Watanabe M, Shindo N, Tsuruta A, Ikeyama H, Hamamura K, Higashi K, Yamashita T, Kondo H, Yoshida Y, Matsuda M, Ogino T, Tokushige K, Itcho K, Furuichi Y, Nakao T, Yasuda K, Doi A, Amamoto T, Aramaki H, Tsuda M, Inoue K, Ojida A, Koyanagi S, Ohdo S.  
Inhibition of G0/G1 Switch 2 Ameliorates Renal Inflammation in Chronic Kidney Disease.  
*EBioMedicine*, 査読有, Volume 13, 2016, pp. 262–273  
DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.10.008.
- ③ Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Azuma H, Hamamura K, Tsuruta A, Tsurudome Y, Ogino T, Hara Y, Suzuki T, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, To H, Aramaki H, Koyanagi S, Ohdo S.  
Circadian clock in a mouse colon tumor regulates intracellular iron levels to promote tumor progression.  
*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Volume 291(13), 2016, pp. 7017–7028  
DOI: 10.1074/jbc.M115.713412.
- ④ Hamamura K, Matsunaga N, Kohro E, Kondo H, Ikeyama H, Tokushige K, Itcho K, Furuichi Y, Yoshida Y, Matsuda M, Yasuda K, Doi A, Yokota Y, Amamoto T, Aramaki H, Irino Y, Koyanagi S, Ohdo S.  
Alterations of hepatic metabolism in chronic kidney disease via D-box binding protein aggravate the renal dysfunction.  
*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Volume 291(10), 2016, pp. 4913–4927  
DOI: 10.1074/jbc.M115.696930.
- ⑤ Kusunose N, Matsunaga N, Kimoto N. K, Akamine T, Hamamura K, Koyanagi S, Ohdo S, Kubota T.  
Mitomycin C modulates the circadian oscillation of clock gene period 2 expression through attenuating the glucocorticoid signaling in mouse fibroblasts.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Volume 467(1), 2015, pp. 157–163.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.086.

〔学会発表〕（計5件）

- ① Hamamura K, Kusunose N, Katsuya- ma S, Komatsu T, Sakurada T.  
Serum exosomes in a mouse model of neuropathic pain enhance the formalin-induced nociceptive response.  
16th World Congress on Pain, 横浜, ポスター発表, 2016年9月26-30日.
- ② 濱村 賢吾, 楠瀬 直喜, 勝山 壮, 小松 生明, 櫻田 司.  
神経障害性モデルマウスの血清中エクソソームは低濃度ホルマリン誘発侵害刺激行動を増強する.  
第36回 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 札幌, ポスター発表, 2016年8月19-20日.
- ③ 居石 奈菜美, 濱村 賢吾, 楠瀬 直喜, 勝山 壮, 西村 友里, 古川 翔太, 田中大晴, 力久 諒派, 荒牧 弘範, 小松 生明, 櫻田 司.  
神経障害性モデルマウスの血清中エクソソームは低濃度ホルマリン誘発侵害刺激行動を増強する.  
第24回クリニカルファーマシーシンポジウム/医療薬学フォーラム2016, 大津, ポスター発表, 2016年6月25-26日.
- ④ 濱村 賢吾, 松永 直哉, 池田 恵理子, 近藤 英明, 池山 久子, 徳重 和孝, 古市 葉子, 吉田 優哉, 松田 将希, 荒牧 弘範, 小柳 悟, 大戸 茂弘.  
慢性腎臓病モデルマウスにおける分子時計機構の腎-肝-腎連関を介した新規腎機能悪化機序の解明.  
第23回クリニカルファーマシーシンポジウム/医療薬学フォーラム 2015, 名古屋, 口頭発表, 2015年7月4-5日.
- ⑤ 松永 直哉, 池田 恵理子, 濱村 賢吾, 近藤 英明, 池山 久子, 徳重 和孝, 古市 葉子, 吉田 優哉, 松田 将希, 荒牧 弘範, 小柳 悟, 大戸 茂弘.  
分子時計機構を基盤とした腎不全進展メカニズム.  
日本薬剤学会第30年会, 長崎, ポスター発表, 2015年5月21-23日.

〔図書〕（計1件）

濱村 賢吾、公益社団法人 日本薬学会学会誌、ファルマシア、2015年12月号

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )