

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16936

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛の増悪に及ぼすエクソソームの役割

研究課題名(英文) Role of exosomes in the aggravation 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームとは、体液中に存在する直径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報告された。しかし、エクソソームと疼痛強度そのものとの関連性は解明されていなかった。我々はこれまでに、坐骨神経部分結紮(partial sciatic nerve ligation: PSNL)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侵害刺激行動を増強することを明らかとした。本研究では、PSNLマウスの血清由来のエクソソーム二重膜上に存在する増悪因子が補体C5であることを同定した。

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見出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(50-150 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 pain have not been elucidated. We have confirmed that 0.5% formalin-induced nociceptive response was significantly enhanced by intrathecal (i.t.) pre-treatment with serum exosomes isolated from partial sciatic nerve ligation (PSNL) but not from sham-operated mice. In addition, exosomes isolated from PSNL were digested with trypsin or exosomes structure was disrupted by surfactant treatment were ineffective on formalin-induced response. In this study, complement C5, which was found by proteomic and other analysis, located on the exosomal membrane derived from PSNL mouse serum plays an important role in potentiating formalin-induced nociceptive behavior.

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 (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、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、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、昨年 1 年間の論文数は 3000 を超えている。

(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。

(4) 申請者はこれまでに、坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation: PSNL) 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侵害刺激行動を増強することを明らかとした【研究活動スタート支援: (課題番号 15H06795)】【若手研究 B: (課題番号 17K18298)】。

### 2. 研究の目的

本研究では、PSNL マウスの血清由来のエクソソームに着目し、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すること、およびエクソソーム中の疼痛強度増悪に関する二重膜上の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目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 坐骨神経部分結紮モデル (PSNL) マウスの作製

坐骨神経部分結紮モデル (PSNL) マウスは、*dty* 系雄性マウス (5 週齢、〔日本エスエルシー株式会社〕) をイソフルラン〔富士フィルム和光純薬株式会社〕麻酔下に、右側大腿上部の坐骨神経を露出させ、8-0 絹糸を用いて坐骨神経の約 1/2 を強く結紮し作製した。坐骨神経を結紮しないマウスを偽手術 (Sham-operated) 群とした。

#### 2. エクソソームの抽出

エクソソームは、PSNL 作術後 7 日目に血清を採取し、ポリマー沈殿濃縮用試薬である ExoQuick〔システムバイオサイエンス社〕を添加後、遠心分離 (1,500 × g, 30 min, 4 °C) し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その後、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、更に精製を行った。

#### 3. DIA (Data-independent acquisition) プロテオーム解析

株式会社ハカレルに委託して行った。エクソソームからタンパク質を抽出後、消化酵素でペプチド断片化し液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトル (LC-MS/MS) で DIA 分析を行った。得られたデータは DIA プロテオーム解析ソフトウェア (Scaffold DIA) を用いて解析し Peptide FDR が 1%以下かつ Protein FDR が 1%以下をとともに満たしたタンパク質・ペプチドの同定ならびに定量値の算出を行った。

#### 4. 低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激と評価方法

低濃度ホルマリン誘発性侵害刺激行動は、0.5%ホルマリン (20 μL) を正常マウスの右後脚の足蹠内 (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 秒間隔で算出することにより評価した。調製したエクソソームは、ホルマリン i.pl 投与の直前に脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) 投与 (5 μL) した。

#### 4. 研究成果

##### 1. エクソソームのプロテオーム解析結果

マウス血清由来エクソソームからは 736 種類のタンパク質を同定、436 種類のタンパク質を選出した。選出した 436 種類のうち、偽手術群に対する PSNL 群の発現量比較を行い、PSNL 群の血清由来エクソソーム群において発現量が 1.3 倍以上増加したものは 66 種類であった(図 1)。

この 66 種の中で補体 C5 に着目し、補体 C5 が侵害刺激増悪因子であることの証明を行動薬理的に行った。

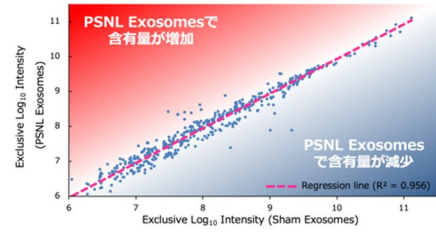


図1 エクソソームのプロテオーム解析結果

##### 2. 補体 C5 が侵害刺激増悪因子であることの証明

- 正常マウスに補体 C5 のリコンビナントタンパク質を投与したのちホルマリンテストを行ったところ、用量依存的に侵害刺激関連行動が増強し、PSNL エクソソームでみられた侵害刺激の悪化が再現できた。
- 野生型 PSNL マウス血清由来のエクソソームでホルマリン誘発侵害刺激行動が増強する用量において、補体 C5 の機能欠損である DBA/2、A/J 系 PSNL マウス血清由来のエクソソームでは侵害刺激行動の増悪がみられなかった。
- 偽手術群および PSNL エクソソームの補体 C5 タンパク質の発現を Western Blotting 法での比較したところ、偽手術群との比較では PSNL 群において発現が増加した(図 2)。この増加は、PSNL 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処理にて除くと消失し、その発現量は偽手術群と同程度であった。偽手術群ではトリプシン処理による影響はみられなかった(図 2)。
- 正常マウスに補体 C5 の受容体拮抗薬を前処置することで、野生型 PSNL マウス血清由来のエクソソームによる侵害刺激増悪が拮抗された。

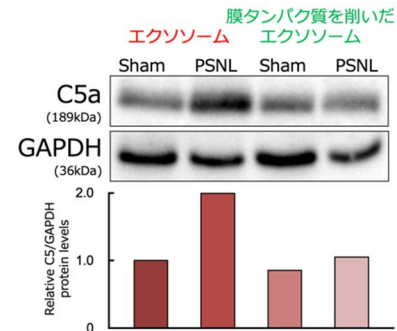


図2 エクソソームにおける補体 C5 の局在

以上より、PSNL マウスの血清由来のエクソソーム二重膜上に存在する補体 C5 が、ホルマリン誘発侵害刺激行動の増悪因子であることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田 康一郎、濱村 賢吾、古賀 真理子、三ヶ尻 幸平、勝山 壮、小松 生明、櫻田 司、有竹 浩介
2. 発表標題 坐骨神経部分結紮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
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hamamura K, Katsuyama S, Komatsu T, Sakurada T, Aritake K.
2. 発表標題 Formalin-induced nociceptive response is enhanced by serum exosomes isolated from partial sciatic nerve ligation (PSL) mice.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SfN) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬 雅美、濱村 賢吾、吉岡 秀哲、勝山 壮、小松 生明、櫻田 司、有竹 浩介.
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスの血清による低濃度ホルマリン誘発侵害刺激行動の増強に、エクソソームは重要な因子である.
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019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
---------	---------