

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11613

研究課題名（和文）エクソソーム二重膜に着目した新たな神経障害性疼痛の治療標的としての可能性

研究課題名（英文）Focusing on the lipid bilayer of exosomes as a potential new therapeutic target for neuropathic pain.

研究代表者

濱村 賢吾（Hamamura, Kengo）

九州大学・薬学研究院・講師

研究者番号：30756466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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50-150 nmの脂質二重膜の小胞である。近年、我々は坐骨神経部分結紮（PSNL）マウスの肝臓から血液中に分泌されたエクソソームの二重膜上で補体C5の発現が増加し、これが痛みを悪化させることを発見した。本研究では、他の神経障害性疼痛モデルマウスを用いて解析を行った。

本研究において、PSNL同様に神経を結紮した場合や糖尿病モデルで同様の事象が生じることを明らかにした。一方で、抗がん剤誘発末梢神経障害モデルでは補体C5の発現が減少し、これは抗がん剤による免疫抑制作用が肝臓補体C5の減少を引き起こし、血中エクソソームに反映されたものであることが明らかとなった。

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やドラッグデリバリーシステム（DDS）の分野で盛んに行われている。我々は、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。従来の研究がエクソソームの内部に焦点を当てていたのに対し、本研究では二重膜上の膜タンパク質に着目し、新たなアプローチを提示した。また、神経障害時の血清エクソソームにおける補体C5の増加は普遍的ではなく、その背後にあるメカニズムの多様性が示唆された。したがって、肝臓における補体C5の変動がエクソソームに反映される具体的な機構についてさらなる研究が必要である。これにより、疼痛管理やその他疾患の治療に新たな展望をもたらすと考える。

研究成果の概要（英文）：Exosomes are lipid bilayer vesicles with a diameter of 50-150 nm that exist in body fluids. Recently, we demonstrated that the expression of complement C5 is increased on the bilayer of exosomes secreted from the liver, which enhances pain. In this study, we analyzed this phenomenon using other neuropathic pain model mice.

We revealed that similar phenomena occur in nerve ligation models and diabetic models. On the other hand, the expression of complement C5 was decreased in a chemotherapy-induced peripheral neuropathy model. This finding reveals that the immunosuppressive effect of chemotherapy causes a decrease in liver complement C5, which is then reflected in the exosomes found in the blood.

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

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 50-150nm 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、昨年 1 年間の論文数は 4000 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) マウスの肝臓より血液中に分泌されたエクソソーム二重膜上で補体 C5 の発現が増加し、この補体 C5 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: (17K18298)】【若手研究: (19K16936)】。

2. 研究の目的

本研究では、PSNL 以外の神経障害性疼痛モデルマウスを用いて、血清由来エクソソーム二重膜上の補体 C5 が、PSNL 同様に疼痛強度の悪化に関与するのかの普遍性を明らかにすることを目的とした。

具体的には、神経を部分的に結紮し作製する、①神経枝結紮損傷 (Spared nerve injury: SNI)、②絞扼性神経損傷 (Chronic constriction injury: CCI)、临床上のニーズが高い③ストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病、④2 型糖尿病 (*ob/ob* マウス) 性末梢神経障害、および抗がん剤 (⑤オキサリプラチン、⑥パクリタキセル) による末梢神経障害モデルの 6 種類の神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、血清由来のエクソソームにおける補体 C5 発現量を比較した。

3. 研究の方法

1. 各種神経障害性疼痛モデルマウスの作製

5 週齢の *ddY* 雄性マウスを使用した。

①神経枝結紮損傷 (Spared nerve injury: SNI) マウスの作製

右足坐骨神経坐骨神経の側枝である総腓骨神経と脛骨神経とを結紮し、両神経の遠位部を切断することにより作製した。作術後 7 日目に血清を採取した。

②絞扼性神経損傷 (Chronic constriction injury: CCI) マウスの作製

右足坐骨神経束を約 1 mm 間隔で 4 ヶ所緩やかに結紮することで作製した。作術後 7 日目に血清を採取した。

③ストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病性神経障害モデルマウスの作製

200 mg/kg を単回尾静脈投与することで作製した。STZ 投与後 7 日目に血清を採取した。

④ *ob/ob* (*C57BL/6JHamSlc*) マウス、野生型 (*C57BL/6JHamSlc-ob⁺/ob⁺*) の 12 週齢目に血清を採取した。

⑤オキサリプラチン (L-OHP) 誘発末梢神経障害モデルマウスの作製

6 mg/kg を単回腹腔内投与することで作製した。L-OHP 投与 3 日後に血清を採取した。

⑥パクリタキセル (PTX) 誘発末梢神経障害モデルマウスの作製
2 mg/kg/day を 5 日間連日腹腔内投与することで作製した。PTX 投与開始後 7 日目に血清を採取した。

2. エクソソームの抽出

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。

4. 研究成果

①SNI、②CCI マウス

PSNL と同様に神経を結紮し作製した SNI、CCI マウスの血清由来エクソソームにおいて、補体 C5 タンパク質発現量が偽手術群と比較して有意に増加した (図 1)。また、SNI、CCI マウス血清エクソソームの脂質二重膜上に発現する膜タンパク質をトリプシンによる酵素処理にて削ぐと、補体 C5 タンパク質発現量が顕著に減少した。

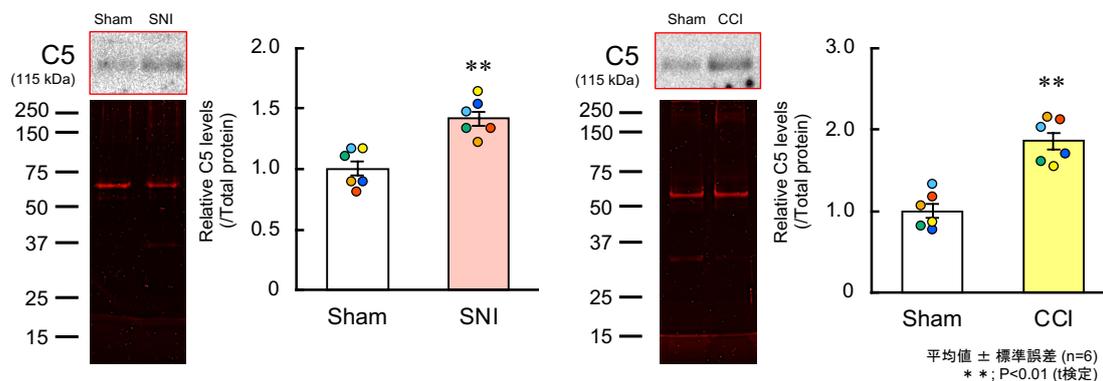


図 1 SNI、CCI マウスの血清由来エクソソームにおける補体 C5 タンパク質発現量比較

③④糖尿病性神経障害モデルマウス (STZ、ob/ob)

STZ 誘発 1 型糖尿病性神経障害モデルマウス、および 2 型糖尿病モデルマウスである *ob/ob* マウスの血清由来エクソソームにおいて、補体 C5 タンパク質発現量が偽手術群と比較して有意に増加した (図 2)。また、STZ、*ob/ob* マウス血清エクソソームの脂質二重膜上に発現する膜タンパク質をトリプシンによる酵素処理にて削ぐと、補体 C5 タンパク質発現量が顕著に減少した。

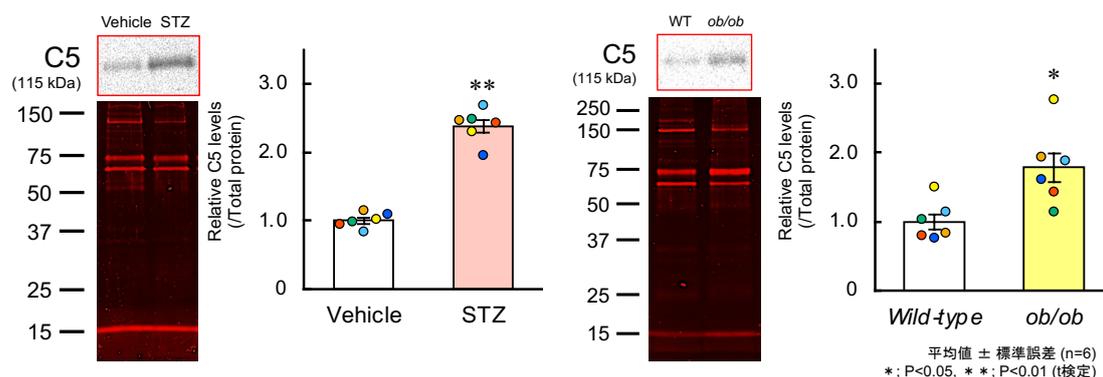


図 2 STZ、*ob/ob* マウスの血清由来エクソソームにおける補体 C5 タンパク質発現量比較

⑤⑥抗がん剤 (オキサリプラチン、パクリタキセル) による末梢神経障害モデルマウス

抗がん剤であるオキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルマウスの血清エクソソームにおいては、補体 C5 のタンパク質発現量は変化がなかった (図 3 左)。また、パクリタキセル誘発末梢神経障害モデルマウスの血清エクソソームにおいては、予想に反して補体 C5 のタンパク質発現量が減少することを明らかとした (図 3 右)。

そこで、血清採取時における肝臓組織中の補体 C5 のタンパク質発現量を比較したところ、オキサリプラチンでは変化がなく、パクリタキセル誘発末梢神経障害モデルマウスの肝臓において補体 C5 のタンパク質発現量が減少していた。したがって本事象は、神経障害性疼痛に伴い肝臓

で増加する補体 C5 が、抗がん剤の免疫抑制作用により減少し、その結果がそのまま血中エクソソームに反映されることが明らかとなった。

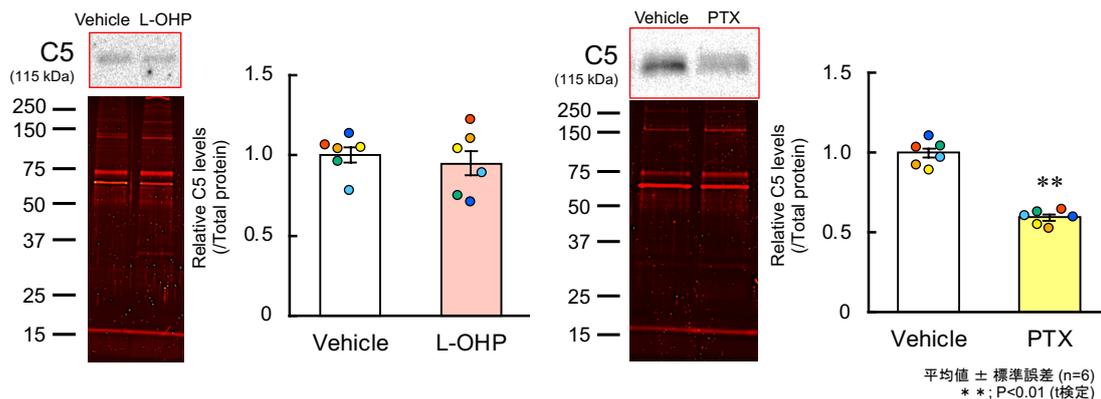


図3 パクリタキセル、オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルマウスの血清由来エクソソームにおける補体 C5 タンパク質発現量比較

本研究の結果より、神経障害時の血清エクソソームにおける補体 C5 の増加は普遍的ではなく、その背後にあるメカニズムの多様性が示唆された。したがって、肝臓における補体 C5 の変動がエクソソームに反映される具体的な機構についてさらなる研究が必要である。これにより、疼痛管理やその他疾患の治療に新たな展望をもたらすと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Yoshida Yuya, Fukuoka Kohei, Sakugawa Miyu, Kurogi Masayuki, Hamamura Kengo, et al.	4. 巻 269
2. 論文標題 Inhibition of G protein-coupled receptor 68 using homoharringtonine attenuates chronic kidney disease-associated cardiac impairment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Translational Research	6. 最初と最後の頁 31～46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trsl.2024.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamamura Kengo, Yoshida Yuya, Oyama Kosuke, Li Junhao, Kawano Shimpei, Inoue Kimiko, Toyooka Keiko, Yamadera Misaki, Matsunaga Naoya, Matsumura Tsuyoshi, Aritake Kosuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Hematopoietic Prostaglandin D Synthase Is Increased in Mast Cells and Pericytes in Autopsy Myocardial Specimens from Patients with Duchenne Muscular Dystrophy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1846～1846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25031846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsurudome Yuya, Yoshida Yuya, Hamamura Kengo, Ogino Takashi, Yasukochi Sai, Yasuo Shinobu, Iwamoto Ayaka, Yoshihara Tatsuya, Inazumi Tomoaki, Tsuchiya Soken, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Higuchi Shigekazu, Sugimoto Yukihiro, Tsuruta Akito, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Prostaglandin F2 Affects the Cycle of Clock Gene Expression and Mouse Behavior	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1841～1841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25031841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Yuya, Fukuda Taiki, Fukuoka Kohei, Nagayama Toshitaka, Tanihara Tomohito, Nishikawa Naoki, Otsuki Kaita, Terada Yuma, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 388
2. 論文標題 Time-Dependent Differences in Vancomycin Sensitivity of Macrophages Underlie Vancomycin-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 218～227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.123.001864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuoka Kohei, Yoshida Yuya, Sotono Kurumi, Nishikawa Naoki, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 675
2. 論文標題 Oral administration of vancomycin alleviates heart failure triggered by chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 92 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.07.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Corasaniti Maria Tiziana, Bagetta Giacinto, Morrone Luigi Antonio, Tonin Paolo, Hamamura Kengo, Hayashi Takafumi, Guida Francesca, Maione Sabatino, Scuteri Damiana	4. 巻 24
2. 論文標題 Efficacy of Essential Oils in Relieving Cancer Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7085 ~ 7085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24087085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Scuteri Damiana, Hamamura Kengo, Watanabe Chizuko, Tonin Paolo, Bagetta Giacinto, Corasaniti Maria Tiziana	4. 巻 23
2. 論文標題 Transgenic Mice for the Translational Study of Neuropathic Pain and Dystonia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8580 ~ 8580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Scuteri Damiana, Rombola Laura, Hayashi Takafumi, Watanabe Chizuko, Sakurada Shinobu, Hamamura Kengo, Sakurada Tsukasa, Tonin Paolo, Bagetta Giacinto, Morrone Luigi A., Corasaniti Maria Tiziana	4. 巻 27
2. 論文標題 Analgesic Characteristics of NanoBEO Released by an Airless Dispenser for the Control of Agitation in Severe Dementia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4987 ~ 4987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27154987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Scuteri Damiana, Rombola Laura, Crudo Michele, Watanabe Chizuko, Mizoguchi Hirokazu, Sakurada Shinobu, Hamamura Kengo, Sakurada Tsukasa, Morrone Luigi Antonio, Tonin Paolo, Bagetta Giacinto, Corasaniti Maria Tiziana	4. 巻 14
2. 論文標題 Translational Value of the Transdermal Administration of Bergamot Essential Oil and of Its Fractions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14051006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Scuteri Damiana, Rombol Laura, Crudo Michele, Watanabe Chizuko, Mizoguchi Hirokazu, Sakurada Shinobu, Hamamura Kengo, Sakurada Tsukasa, Tonin Paolo, Corasaniti Maria Tiziana, Bagetta Giacinto	4. 巻 14
2. 論文標題 Preclinical Characterization of Antinociceptive Effect of Bergamot Essential Oil and of Its Fractions for Rational Translation in Complementary Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 312 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14020312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoo Hidetomo, Shibata Norihito, Endo Akinori, Ito Takahito, Yanase Yuta, Murakami Yuki, Fujii Kiyonaga, Hamamura Kengo, Saeki Yasushi, Naito Mikihiro, Aritake Kosuke, Demizu Yosuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Discovery of a Highly Potent and Selective Degradable Targeting Hematopoietic Prostaglandin D Synthase via In Silico Design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15868 ~ 15882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c01206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Scuteri Damiana, Rombol Laura, Natoli Silvia, Pisani Antonio, Bonsi Paola, Hamamura Kengo, Bagetta Giacinto, Tonin Paolo, Corasaniti Maria Tiziana	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploitation of Thermal Sensitivity and Hyperalgesia in a Mouse Model of Dystonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 985 ~ 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11090985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuya, Matsunaga Naoya, Nakao Takaharu, Hamamura Kengo, Kondo Hideaki, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki, Tsuruta Akito, Kurogi Masayuki, Nakaya Michio, Kurose Hitoshi, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23050-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 濱村賢吾、井上貴美子、豊岡圭子、山寺みさき、有竹浩介、松村剛
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者心臓における造血管型プロスタグランジンD合成酵素の発現解析
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hamamura Kengo, Sakurada Tsukasa, Aritake Kosuke.
2. 発表標題 Novel enhancement mechanisms of the nociceptive response by serum exosomes in a mouse model of neuropathic pain
3. 学会等名 Dementia Therapeutics and Cognitive Rehabilitation
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱村賢吾、切通雅哉、山川満里奈、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二重膜上で発現量が増加する補体C5の産生部位同定
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------