

氏 名	藤原 淳
(ふりがな)	(ふじわら あつし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 1201 号
学位審査年月日	令和2年7月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Stiripentol alleviates neuropathic pain in L5 spinal nerve-transected mice (スチリペントールは脊髄 L5 神経切離マウスの神経障害性疼痛を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 根尾 昌志 教授 日下 裕介 教授 朝日 通雄

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### <目 的>

抗てんかん薬であるスチリペントールの乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) 阻害作用に着目して神経障害性疼痛に対するスチリペントールの鎮痛効果を検証することを目的とした。

#### <方 法>

ddY マウス (3 週齢♂) の脊髄 L5 神経を切離して作製した神経障害性疼痛モデルを用いて、以下のプロトコールで実験を行った。マウスは各群 5 もしくは 6 匹で、薬剤は全て脊髄腔内に 5  $\mu$ L に溶解して投与した。

## 1 スチリペントールによる鎮痛効果

### 1-1 行動学的評価 (von Frey 試験)

脊髄 L5 神経の切離処置後 7 日目にスチリペントールを 2500 ng (2.5  $\mu$ g)、250 ng、25 ng、2.5 ng 投与し、機械的刺激による疼痛閾値の変化を薬剤投与 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 分後に測定した。同様に処置後 14、28 日目にも測定した。また、他の抗てんかん薬と鎮痛効果を比較するために、処置後 7 日目にスチリペントール 1  $\mu$ g、ガバペンチン 1  $\mu$ g、カルバマゼピン 1  $\mu$ g を投与し、各群の疼痛閾値を経時的に評価した。機械的刺激の評価は、無拘束の状態で網の上に置いたマウスの足底に、あらかじめ太さで圧刺激の強さが設定されているフィラメントを細いものから太いものへと順に垂直にフィラメントが曲がる直前まで押しつけ、逃避反射した時のフィラメントの圧閾値を記録した。

### 1-2 行動学的評価 (plantar 試験)

処置後 7 日目にスチリペントール 2  $\mu$ g を投与し、薬剤投与 30、60、90、120 分後にマウスの足底に投射熱刺激を加え、逃避反射の潜時を測定した。

### 1-3 免疫組織学的評価

脊髄後角のアストロサイトの活性を観察するために、アストロサイトに特異的な glial fibrillary acid protein (GFAP) 染色を用いて免疫組織学的評価を行った。処置後 7 日目にスチリペントール 1  $\mu$ g、ガバペンチン 1  $\mu$ g、カルバマゼピン 1  $\mu$ g を投与し、120 分後に脊髄 L5 部分を採取し、スライスした切片に抗 GFAP 抗体を加えて反応させた。脊髄後角の膠様質部分の浅層と深層部分を同定し、同領域の蛍光イメージの信号強度を測定した。

## 2 神経障害性疼痛とアストロサイト-ニューロン乳酸代謝経路 (astrocyte-neuron lactate shuttle; ANLS) の関係

処置後 7 日目にスチリペントール 1  $\mu$ g、ガバペンチン 1  $\mu$ g、カルバマゼピン 1  $\mu$ g に加えて乳酸 1  $\mu$ g を同時に投与し、von Frey 試験による機械的刺激によって疼痛閾値を測定した。また、処置後 7 日目にモノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter; MCT) 阻害剤である  $\alpha$ -CHCA 2  $\mu$ g に加えてピルビン酸 2  $\mu$ g、乳酸 2  $\mu$ g をそれぞれ同時に投与し、機械的刺激によって疼痛閾値を測定した。

### 3 スチリペントールおよび $\alpha$ -CHCA による協調運動の評価 (Rota-rod テスト)

薬剤の協調運動に対する影響を評価するために、無処置のマウスにスチリペントール 2  $\mu$ g または $\alpha$ -CHCA 2  $\mu$ g を投与し、一定のスピードで回転する丸棒の上で強制歩行させ、落下までの時間を測定した。

### 4 統計解析

行動評価は、対照群との比較に Student's t 検定、Mann-Whitney U 検定または Dunnett's procedure を用いて解析を行った。また、免疫組織学的評価は、各群の蛍光強度の比較に non-repeated measures ANOVA による解析後、Bonferroni による多重比較を行った。全ての統計手法の有意水準は、5%未満とした。

## <結 果>

### 1 スチリペントールによる鎮痛効果

#### 1-1 行動学的評価 (von Frey 試験)

処置後 1 日目より、神経障害性疼痛モデルの処置側は、非処置側と比較して有意に疼痛閾値が低下し、術後 28 日目まで疼痛閾値の低下は持続した。スチリペントール投与群は、カルバマゼピンおよびガバペンチンと同様に処置後 7、14、28 日目において生食投与群と比較して用量依存性に疼痛閾値の改善を認めた。

#### 1-2 行動学的評価 (plantar 試験)

スチリペントール投与群は、生食投与群と比較して熱刺激による疼痛閾値は改善傾向であったが、統計学的有意差は認められなかった。

#### 1-3 免疫組織学的評価

スチリペントール、カルバマゼピンおよびガバペンチンの各群とも処置側の脊髄後角の浅層において GFAP シグナルの増強を認めたが、処置側と非処置側のシグナル強度比の群間比較に有意差を認めなかった。

### 2 神経障害性疼痛と ANLS の関係

スチリペントールおよびカルバマゼピンの単独投与により神経障害性疼痛に対して疼痛

閾値の改善を認めたが、乳酸の同時投与により疼痛閾値の低下を認めた。また、 $\alpha$ -CHCAの単独投与により神経障害性疼痛に対して疼痛閾値の改善を認めたが、乳酸もしくはピルビン酸の同時投与により疼痛閾値の低下を認めた。

### 3 スチリペントールおよび $\alpha$ -CHCAによる協調運動の評価 (Rota-rod テスト)

スチリペントールおよび $\alpha$ -CHCAは、協調運動に影響を認めなかった。

#### <考察および結語>

抗てんかん薬であるスチリペントールが神経障害性疼痛に対して鎮痛効果があることを明らかにし、その効果はLDH阻害によることとANLSが神経障害性疼痛の発現維持に関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

神経障害性疼痛は、難治性の慢性疼痛で既存の治療薬が奏功していないのが現状である。一方、てんかんと神経障害性疼痛の病態には、異所性発火による神経機能の変調が発病因子となる類似点がある。そのため、治療薬の一つに抗てんかん薬が用いられるが、作用機序は不明な点が多い。スチリペントールは、難治性てんかんである Dravet 症候群の患者に対して臨床使用されており、その薬理学的作用機序は乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) 阻害による。申請者は、スチリペントールの LDH 阻害作用に着目し、脊髄 L5 神経切離により作製した神経障害性疼痛モデルマウスを用いてスチリペントールの鎮痛効果を検証し、以下の知見を得た。

1. スチリペントールは神経障害性疼痛に対して鎮痛効果があることが明らかになった。
2. スチリペントールの神経障害性疼痛に対する作用機序は、LDH 阻害によることが示唆された。
3. 神経障害性疼痛の発現維持にアストロサイト-ニューロン乳酸代謝経路 (astrocyte-neuron lactate shuttle; ANLS) が関与していることが示唆された。

以上より、スチリペントールが、新規の機序を有する神経障害性疼痛治療薬として使用できる可能性が考えられる。また、神経障害性疼痛の発現・維持に ANLS が関与していることから、さらなる創薬の開発に発展し、神経障害性疼痛患者の QOL の向上につながることを期待できる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Anesthesia 34(3): 373-381, 2020 in press

doi: 10.1007/s00540-020-02762-2 <オンライン掲載>