

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16763

研究課題名（和文）神経障害痛に対するLactate Dehydrogenase阻害の鎮痛効果

研究課題名（英文）Analgesic effect of lactate dehydrogenase inhibitor in neuropathic pain

研究代表者

藤原 淳 (Fujiwara, Atsushi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00773516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：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、次の知見を得た。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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that stiripentol alleviated the pain threshold in L5SNT mice and that ANLS was associated with neuropathic pain. Since there is no single treatment effective in alleviating neuropathic pain, the present study provides a new target for the treatment of neuropathic pain and suggests that, like gabapentin and pregabalin, stiripentol can be used as a therapeutic drug for neuropathic pain.

研究分野：麻酔科学

キーワード：Neuropathic pain Stiripentol Lactate dehydrogenase Astrocyte Spinal cord

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経から大脳に至るまでの侵害情報伝達経路のどこかに病変や疾患が存在すると、神経応答の過敏な状態が持続する、いわゆる神経障害性疼痛を引き起こす。神経障害性疼痛は、痛覚過敏や触覚に対する異常な痛みを伴うため、日常生活に大きな支障をもたらす。治療薬に抗てんかん薬が用いられるが、作用機序は不明な点も多い。一方、神経活動は、乳酸をエネルギーとして利用する経路が存在する。これは、アストロサイト-ニューロン乳酸代謝経路 (astrocyte-neuron lactate shuttle; ANLS) と称され、その経路上には代謝酵素である乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) が存在する。近年、てんかんの治療薬であるスチリペントールが、既存の抗てんかん薬の中で唯一 LDH を阻害することでてんかんに制御していることが明らかになった。しかし、神経障害性疼痛と ANLS の関係は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、スチリペントールの 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および神経障害性疼痛と ANLS の関係を検証した。

3. 研究の方法

3 週齢、雄、ddY マウスの脊髄 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。

(1) スチリペントールによる鎮痛効果

① 行動学的評価 (von Frey 試験)

神経障害性疼痛が確立する脊髄 L5 神経の切離処置後 7 日目にスチリペントールを脊髄腔内に投与し、機械的刺激で疼痛閾値の変化を経時的に評価した。また、他の抗てんかん薬と鎮痛効果を比較するために、術後 7 日目にスチリペントール、ガバペンチン、カルバマゼピンを投与し、各群の疼痛閾値を経時的に測定した。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、逃避反射を示した時のフィラメントの圧閾値を記録した。

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を脊髄腔内に投与し、マウスの足底に投射熱刺激を加え、逃避反射の潜時を経時的に測定した。

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測するために、アストロサイトに特異的な glialfibrillary 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、ガバペンチン、カルバマゼピンを脊髄腔内に投与した後に脊髄 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評価した。

(2) 神経障害性疼痛と ANLS の関係

グルコースは、アストロサイト内でピルビン酸に代謝された後 LDH によって乳酸に変換され、モノカルボン酸トランスポーター (monocarboxylate transporter; MCT) でアストロサイトから神経細胞に輸送され、再び LDH によってピルビン酸に変換された後、tricarboxylic acid (TCA) 回路の基質となり、神経の電気活動が維持される。この ANLS と神経障害性疼痛の関係を検証す

る実験として、術後7日目にスチリペントール、ガバペンチン、カルバマゼピンに乳酸を同時に投与し、von Frey 試験による機械的刺激で疼痛閾値を評価した。また、術後7日目にMCT阻害剤である α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) にピルビン酸、乳酸をそれぞれ同時に投与し、機械的刺激で疼痛閾値を測定した。

(3) スチリペントールおよび α -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または α -CHCA を脊髄腔内に投与し、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 analysis of variance による解析後、Bonferroni による多重比較を行った。統計の有意水準は、5%未満とした。

4. 研究成果

(1) スチリペントールによる鎮痛効果

① 行動学的評価 (von Frey 試験)

スチリペントールは、カルバマゼピンおよびガバペンチンと同様に用量依存性に神経障害性疼痛モデルマウスに対して疼痛閾値の改善を認めた (図1、2)。

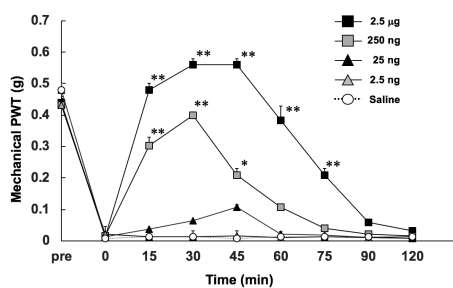


図1 神経障害性疼痛に対するスチリペントールの鎮痛効果

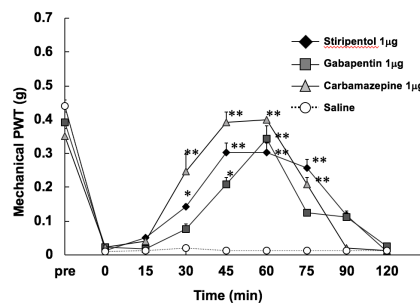


図2 各抗てんかん薬の神経障害性疼痛に対する鎮痛効果の比較

② 行動学的評価 (plantar 試験)

スチリペントールは、神経障害性疼痛モデルマウスの熱刺激に対する疼痛閾値を改善させたが、生食投与と比較して統計学的有意差を認めなかった (図3)。

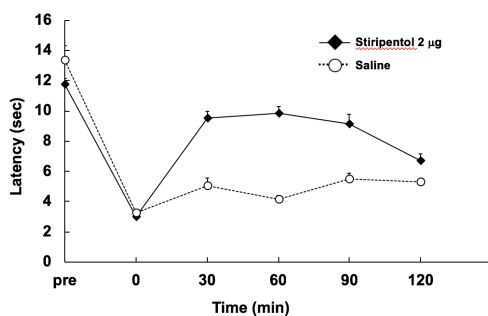


図3 熱刺激に対するスチリペントールの効果

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は、神経障害性疼痛で見られるアストロサイトの形態的な活性に影響を与えなかった (図4、5)。

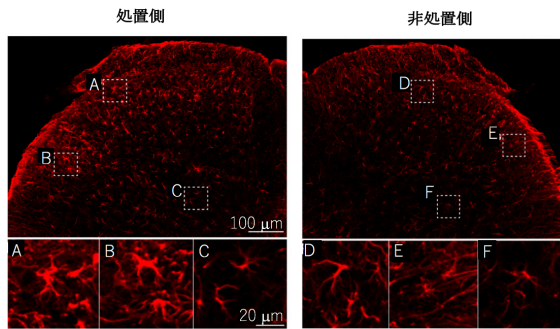


図4 脊髄後角のGFAP染色

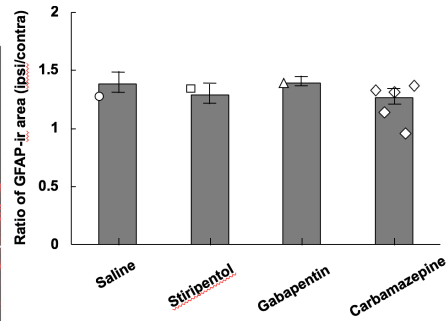


図5 神経障害性疼痛に対して各抗てんかん薬を投与した際の脊髄後角におけるアストロサイトの活性の左右比

(2) 神経障害性疼痛とANLSの関係

スチリペントールおよび α -CHCAの単独投与により神経障害性疼痛モデルマウス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を同時投与することにより疼痛閾値は低下した (図6、7)。

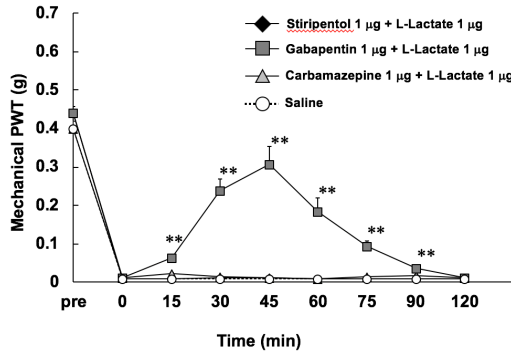


図6 神経障害性疼痛に対して各抗てんかん薬と乳酸を同時に投与した際の疼痛閾値の変化

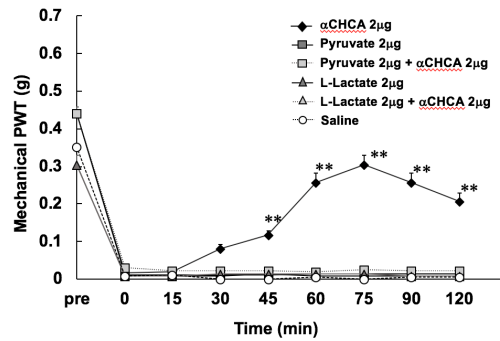


図7 神経障害性疼痛に対して α -CHCA単独および乳酸、ピルビン酸を同時に投与した際の疼痛閾値の変化

(3) スチリペントールおよび α -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 α -CHCAは、協調運動に影響を認めなかった (図8)。

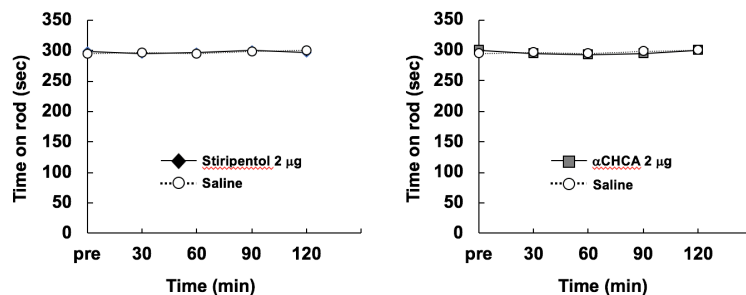


図8 Rota-rodテストによる協調運動評価

本研究シエーマを図9に示す。

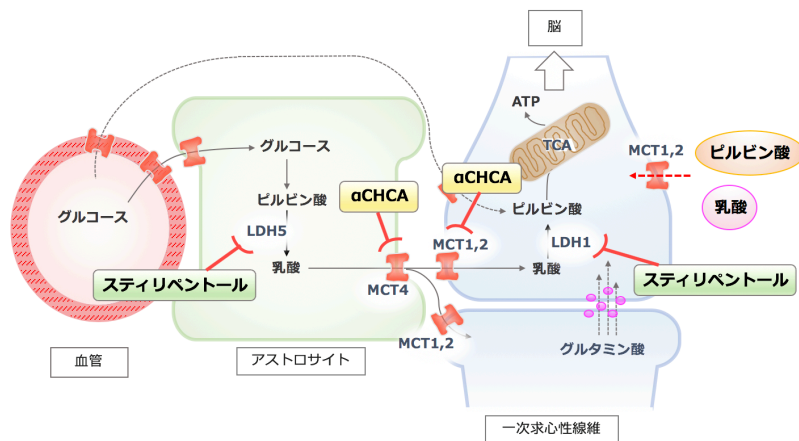


図9 ANLSの代謝経路を示す。ステリペントールによりLDHを阻害することにより、疼痛閾値は改善する。また、 α -CHCAによりMCTを阻害することにより疼痛閾値は改善する。ステリペントールおよび α -CHCAに乳酸もしくはピルビン酸を同時に投与することにより、疼痛は再燃する。

以上の結果より、ステ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となり、またその作用機序がLDH阻害によることが示唆された。さらに、神経障害性疼痛の発現維持にANLSが関与していることが示唆され、本研究結果の論文発表を行った(J Anesth, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara Atsushi, Nakao Kenta, Ueno Takeshi, Matsumura Shinji, Ito Seiji, Minami Toshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Stiripentol alleviates neuropathic pain in L5 spinal nerve-transected mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-020-02762-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤原淳、南敏明、松村伸治、上野健史、中尾謙太、伊藤誠二
2. 発表標題 Stiripentolは神経障害性疼痛モデルマウスの疼痛閾値を改善させる
3. 学会等名 日本麻酔科学会第36回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Fujiwara, Nakao Kenta, Ueno Takeshi, Matsumura Shinji, Ito Seiji, Toshiaki Minami
2. 発表標題 Stiripentol Alleviates Neuropathic Pain in Mice
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	南 敏明 (Minami Toshiaki) (00257841)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	上野 健史 (Ueno Takeshi) (70782283)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	
研究協力者	伊藤 誠二 (Ito Seiji) (80201325)	大阪医科大学・医学部・客員教授 (34401)	
研究協力者	松村 伸治 (Matsumura Sinji) (70276393)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	