

主論文の要旨

**Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by
suppressing microglial activation in the spinal cord
in a mouse model**

〔ゾニサミドは脊髄におけるミクログリアの活性化抑制を一部介して
マウスモデルにおける神経障害性疼痛を緩和する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

小清水 宏行

【緒言】

神経障害性疼痛の原因としては主に外傷、糖尿病、脊柱管狭窄、感染症等による神経損傷が原因であることが多い。現在神経障害性疼痛にはプレガバリンや非ステロイド性抗炎症薬が処方されているが、通常ほとんどの症例で効果は限定的であり、時には副作用を伴うこともある。神経障害性疼痛の根底にある細胞メカニズムはまだほとんど解明されていないが、近年中枢神経系(CNS)の免疫担当細胞であるミクログリアが神経障害性疼痛の誘発に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

抗てんかん薬である Zonisamide (ZNS) はパーキンソン病 (PD) マウスモデルの脳内において、ミクログリアを介する神経炎症を抑制する効果が報告されている。また神経障害性疼痛に対しても効果があるとの報告が散見されるが、作用機序はいまだ不明であった。本研究では L4 神経根を切断した神経障害性疼痛マウスモデルを用いて、ZNS の神経障害性疼痛に対する効果と脊髄におけるミクログリアへの影響を調べた。また培養ミクログリアと培養感覚神経を用いて ZNS の効果を評価した。

【対象及び方法】

12-14 週の雄 C57BL/6 マウスの L4 神経根を切断し、神経障害性疼痛の 1 つであるアロディニアを誘発させた。5 週間毎日 ZNS を 30 mg/kg/day を経口投与し、疼痛評価として週 1 回 von Frey test、Cat walk test を行った。投与後 4 週目に組織学的評価としてミクログリアの数と面積を計測するため、L4 脊髄後角を採取し抗 Iba1 抗体を使用して免疫染色も行った。加えて神経障害性疼痛の発生に関連する遺伝子発現を検出するため、先と同様に L4 脊髄後角を採取し qRT-PCR を行った。全ての実験において L4 神経根切断後溶媒のみを経口投与した Control 群と比較した。また ZNS のミクログリアに及ぼす影響を検討するためマウス由来の BV2 細胞株を LPS 刺激で活性化させ、さらに異なる濃度の ZNS を添加して 24 時間後に遺伝子発現量を定量的 qRT-PCR で検討した。ZNS の感覚神経に対する効果を評価するためにラット Dorsal root ganglion 由来細胞株 50B11 に異なる濃度の ZNS を添加して 48 時間後に抗 PGP9.5 抗体を用いて免疫染色を行い、軸索伸張について Array Scan を用いて測定した。

【結果】

作製したアロディニアマウスモデルに ZNS 経口投与を行うと 5 週間目で、von Frey test において疼痛の改善が認められた (図 1A)。また 4 週間目で、Cat walk test において Max contact max intensity (最大接地における最大輝度) と Duty cycle (歩行周期中の立脚期の割合) の値が上昇し疼痛の改善による歩行運動の改善が考えられた (図 1CD)。また抗 Iba1 抗体を使用した免疫染色では 4 週間 ZNS 投与により脊髄後角におけるミクログリアの数と面積が減少傾向であった (図 2A-C)。加えて、PD 患者の死後脳における活性化ミクログリアで発現が増加していると言われているニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) オキシダーゼの触媒サブユニットである cybb、活性化した M1 ミクログリアのマーカーである Cd68、ミクログリア活性化に関

わる *Irf5* や *Irf8*、および炎症反応関連遺伝子である *Illb* が、4 週間 ZNS 投与マウスの脊髄後角組織において有意に抑制されることが qRT-PCR によって明らかとなった(図 3)。これらの結果から、アロディニアマウスモデルの脊髄後角において ZNS 投与はミクログリア活性化マーカーや炎症性サイトカインの発現を抑制していることが示唆された。

MTS アッセイを用いて 50 ng/ml の LPS 刺激下で ZNS を 0-10 μ M の範囲で添加しても細胞生存率に変化がないことを確認した(図 4A)。一方 ZNS 添加により LPS 刺激によりアメーバ状の形態となった BV2 細胞株の数は有意に減少していた(図 4BC)。また、BV2 細胞株において LPS 刺激で上昇した *Cybb*、炎症反応関連遺伝子である *Tnf*、マウス特異的ミクログリアマーカーである *Adgre1* の遺伝子発現は ZNS 添加で有意に減少していた(補足図 S1B-D)。

50B11 細胞株に対して ZNS が 0-20 μ M の範囲内で有害性はないことを確認した(図 5A)。50B11 細胞株の軸索の Average neurite length 及び Average number of branch points per neuron は ZNS 添加により有意に上昇した(図 5BC)。

【考察】

我々はまず、抗てんかん薬・抗 PD 薬である ZNS が、L4 脊髄神経の切断で誘発した神経障害性疼痛のマウスモデルにおいて、抗アロディニア効果を発揮することを発見した(図 1A-D)。脊髄神経損傷は脊髄後角のミクログリアを活性化する、またこのミクログリアの活性化は神経障害性疼痛と因果関係があると考えられている。本研究では、事実このアロディニアマウスモデルにおいて、ミクログリアの細胞形態の変化と増殖、免疫表面抗原の増加と炎症性サイトカインの産生増加が見られている(図 2A-C)。このとき、ZNS 投与により神経損傷測の L4 脊髄後角における *Iba1* 陽性ミクログリアの増加が抑制され(図 2A-C)、また、ZNS 添加により LPS によるアメーバ状の培養 BV2 ミクログリアの数が減少していた(図 4BC)。加えて ZNS 処理は、マウスモデル(図 3)の脊髄後角の損傷部および培養 BV2 ミクログリアの双方において、*Cybb*、*Tnf* および *Adgre1* の遺伝子発現を抑制した(補足図 S1B-D)。他の論文で、同様の遺伝子発現抑制作用は、PD マウスモデルの基底核において報告されている。また ZNS が急性の熱性および機械的侵害刺激に対しての鎮痛効果も示されている。以上のことから、ZNS がナトリウムチャンネルおよび T 型カルシウムチャンネルを阻害することで抗アロディニア効果を示す可能性も残っているが、一方で ZNS は少なくとも一部、後角のミクログリアを介した一連の神経炎症性シグナル伝達イベントを抑制することで、抗神経障害効果を発揮していると考えられた。

我々は以前 ZNS が一次脊髄運動神経(SMN)の軸索伸長を誘導することを報告したが、本研究では、ZNS が 50B11 細胞株の分岐点数をわずかに増加させ、神経突起の伸長を促進することを示した(図 5BC)。我々の結果と同様に ZNS は後根神経節由来の一次感覚神経の軸索伸長を促進するという報告がある。一方、損傷を受けた一次求心性感覚神経の異常発芽が末梢神経障害性疼痛の病態を促進しているという報告もされており、神経障害性疼痛において ZNS の感覚神経に対する軸索伸長効果がミクログリ

アに対する効果を弱めている可能性も否定できない。将来的に ZNS を臨床的に利用できるようにするため、例えば動物モデルを用いて抗アロディニア効果を指標に投与量や投与プロトコルを最適化する追加試験が必要であると考えられる。

【結語】

ZNS はアロディニアを起こしたマウスにおいて脊髄後角におけるミクログリアの数を減らし、抗炎症作用を示し神経障害性疼痛を改善させた。また BV2 細胞株においても抗炎症作用を示し、50B11 細胞株の軸索伸長を促した。これらの結果から ZNS は神経障害性疼痛に対する治療薬となる可能性が示唆された。