

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18072

研究課題名(和文) 前帯状皮質におけるケタミン及びケタミン代謝物の疼痛抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pain suppression mechanism of ketamine and ketamine metabolites in the anterior cingulate cortex

研究代表者

山中 学 (Yamanaka, Manabu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30597084

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)：静脈麻酔薬であり低濃度ケタミンにおける鎮痛メカニズムを明らかにするため、マウスの前帯状皮質のII/III層ニューロンにホールセルパッチクランプ法を用いてシナプス可塑性変化の記録を行った。また、前帯状皮質にマイクロインジェクションすることで行動学的実験も行った。結果は、低濃度ケタミンおよびケタミン代謝物は過分極ヌクレオチドチャンネルを抑制することでシナプス可塑性変化を抑制することが明らかとなった。また、神経障害性モデルにおいてこれらの薬剤は疼痛抑制および不安様行動を抑制することが明らかとなった。以上より低濃度ケタミンは前帯状皮質に作用することで慢性疼痛治療の薬剤となる可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケタミンは大脳皮質に選択的に作用する解離性麻酔薬であるため、他の一般的な麻酔薬と比較し、低用量帯では呼吸を抑制しない大きな利点がある。近年、低用量ケタミン及びその代謝物が抗うつ作用を示すことが報告されており、米国食品医薬品局は2019年3月に治療抵抗性うつ病薬として、ケタミン点鼻薬を認可している。本研究により、メカニズムが明らかとなり、ケタミン及びケタミン代謝物は慢性疼痛を緩和させる可能性を有していると考えられる。新規の治療薬を開発するのではなく、既存の薬を転化応用するというドラッグリポジショニングにより、莫大な開発費の抑制と時間の短縮をもたらし、患者に短期間で有用な治療薬を提供できると考える。

研究成果の概要(英文)：To clarify the analgesic mechanism of low-concentration ketamine, an intravenous anesthetic, we recorded synaptic plasticity in layer II/III neurons of the anterior cingulate cortex of mice using the whole-cell patch clamp method. We also performed behavioral experiments by microinjection of ketamine into the anterior cingulate cortex. The results showed that low-concentration ketamine and ketamine metabolites inhibited synaptic plasticity by inhibiting hyperpolarized nucleotide channels (HCN channel). In addition, it was revealed that these drugs inhibited pain inhibition and anxiety-like behavior in neuropathic models. These results demonstrated that low-concentration ketamine may be a drug for the treatment of chronic pain by acting on the anterior cingulate cortex.

研究分野：neuroscience

キーワード：Ketamine Ketamine metabolites whole cell patch clamp ACC LTP

1. 研究開始当初の背景

痛みは生命の危険や異常を察知するために重要な警告サインであり、人類が進化の過程でわざわざ獲得した生存するために必要不可欠な感覚系の一システムである。しかし、痛みが必要以上に強くなり、持続してしまう慢性疼痛は ADL や QOL を著しく低下させ、単なる有害な事象となってしまう。国民生活基礎調査でも、腰痛や肩こり、関節痛といった慢性的な疼痛の有訴者数は極めて多く、国民病とも言ってもよい。さらに慢性疼痛の患者はしばしば不安など情動の不調を訴える。また、不安が慢性疼痛を増強する可能性が示唆されている。大脳皮質のうち、前帯状回は感覚認知や感情応答など様々な高次の脳機能を持つことが知られている。ヒトにおけるイメージングや動物を用いた研究により、前帯状回が痛みや侵害受容に関与すること、また、前帯状回が不安に関与することが示唆されている。前帯状回におけるシナプス伝達の亢進が不安及び侵害の受容に寄与しており、我々はこれらの相互作用に 2 つのタイプの長期増強 (Long-term potentiation、以下 LTP) が関与していることを明らかにした。LTP は中枢神経系における活動に依存的なシナプスの可塑性の主なモデルであり、記憶及び学習の分子機序と考えられている。NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) を介する Postsynaptic LTP (Post-LTP) と介さない Presynaptic LTP (Pre-LTP) が存在するが、これまでに大脳皮質において、Post-LTP の機序が多く研究されてきた。我々は、Pre-LTP が不安を説明するメカニズムであることを明らかにし、神経障害モデルにおいて、Pre-LTP を抑制することで疼痛逃避行動が緩和されることも報告した。近年、整形外科分野において、慢性疼痛、神経障害性疼痛に対して積極的な加療が行われるようになり、プレガバリン、デュロキセチン、弱オピオイドなどを使用しているが、十分な治療効果を得られていないことも多い。したがって、別の作用機序を持つ、新たな鎮痛薬がさらに望まれているのは言うまでもない。ケタミンは大脳皮質に選択的に作用する解離性麻酔薬であるため、他の一般的な麻酔薬と比較し、低用量帯では呼吸を抑制しない大きな利点がある。近年、低用量ケタミン及びその代謝物が抗うつ作用を示すことが報告されており、米国食品医薬品局は 2019 年 3 月に治療抵抗性うつ病薬として、ケタミン点鼻薬を認可している。しかし、そのメカニズムは依然、不明であり、不安と慢性疼痛が関連していることからケタミン及びケタミン代謝物は慢性疼痛を緩和させる可能性を有していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、前帯状皮質 (ACC) にパッチクランプ法を用いて電気生理学的にケタミンの作用メカニズムを解析し、神経障害性モデルに対する影響を行動学的実験にて解析することでケタミン及びケタミン代謝物の疼痛緩和の可能性を解明することである。

3. 研究の方法

本研究ではまずパッチクランプ法を前帯状皮質に適応し、ケタミン及びケタミン代謝物の脳内シナプス伝達に対する作用機序を電気生理学に分子メカニズムを解明する。次に神経障害性モデルマウスを用いて、ケタミン及びケタミン代謝物の前帯状皮質への Microinjection を行い、von Frey test、Hot plate test、を用いた行動学的評価を行う。

【2020 年度】

マウスの脳冠状断スライスを用いたケタミンの LTP 抑制メカニズムの検討

<マウス脳冠状断スライスに対するパッチクランプ法>

C57/BL 雄性マウス(6~10 週齢)を5% isoflurane で吸入麻酔後、脳を摘出しマイクロスライサーを用いて約 300 μm の厚さの脳冠状断スライス標本を作成する。前帯状皮質を含んだスライスを酸素負荷した低温人工脳脊髄液に1時間灌流したのち、スライスを記録チャンバーに移し、前帯状皮質 V 層に刺激電極を置き、II/III 層の細胞にホールセルパッチクランプを行い種々の記録モードで膜電位、膜電流記録を行う。

予備実験で脊髄後角細胞に対するケタミンの作用を確認した。脳にケタミンを灌流投与すると Pre-LTP を抑制する作用(すなわちグルタミン酸の放出抑制を意味する)を確認できた(【図2】参照)。これは神経細胞のシナプス可塑性変化を抑制する作用である。この抑制作用に関して、薬理的な解析を行い、分子メカニズムを電気生理学的に明らかにしたい。

- (1) Post-LTPに対するケタミンの影響を解析する。
- (2) NMDA受容体電流に対するケタミンの作用を解析する。また濃度依存性(1 μM、10 μM、100 μM)についても検討する。

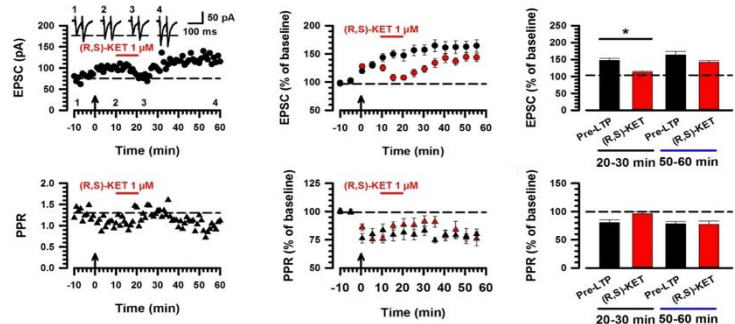


図2 Pre-LTP に対するケタミンの抑制

- (3) NMDA受容体に対するケタミンと同じ結合部位に結合するNMDA受容体遮断薬(MK-801)の Post-LTPに対する作用を解析する。
- (4) Pre-LTPに対するケタミン代謝物()の影響を解析する。

【2021 年度】

2020 年度にはホールセルパッチクランプ法を用いて、ACC におけるケタミンの作用を解析した。本年度は ACC へ神経線維を投射している視床細胞にホールセルパッチクランプ法を適応し、ケタミン及びケタミン代謝物の作用を検討する。

方法は、前帯状皮質に投射する視床細胞にホールセルパッチクランプを行い、過分極ヌクレオチドチャネル電流を測定し、ケタミン及びケタミン代謝物の作用を解析する。前帯状皮質に投射する視床細胞の同定には逆行性トレーサーである(Dil)をスライス作成1週間前にACCに注入し、記録を行う際に蛍光顕微鏡下に確認し、発色している細胞から記録を行う。なお、記録電極内液には biocytin を混入させておき、記録後に固定し免疫染色にて確認を行う。(図3参照)

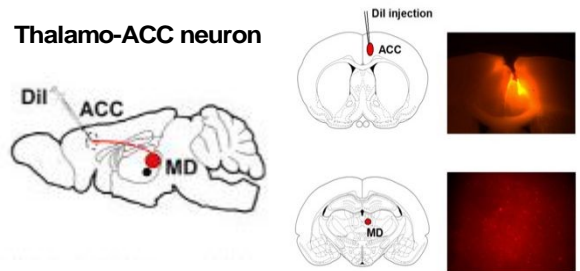


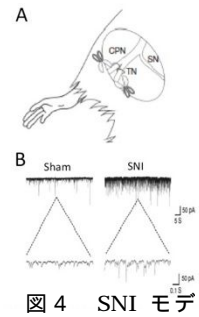
図3 ACC への Dil ラベリング

【2022 年度】

神経障害性疼痛モデルマウスにおけるパッチクランプ法及び行動学的評価

<神経障害性疼痛モデルマウスの作成>

神経障害性疼痛モデルとして、Spared Nerve Injury (SNI) model を用いる。SNI モデルは坐骨神経から分岐する3枝のうち、腓腹神経を残し、総腓骨神経・脛骨神経を結紮・切断することで、アロディニア様の反応を示すようになる(図4参照)。5週齢で作成し、1週後に実験に使用する。



<cannulation と microinjection の手技>

前帯状皮質の頭蓋骨上に左右2か所ドリルで穿孔し、ガイドカニューレを適切な深度に配置する。行動実験15分前にガイドカニューレより0.7mm短い30G注射針を装着したハミルトン注射器を用いて、薬液をマイクロインジェクション(0.5 µL/side、1分以上かけて)する。

SNIモデル群とSham群に生理食塩水、ケタミンおよびケタミン代謝物のマイクロインジェクション投与前後で von Frey test、Hot plate test を用いて行動学的解析を行う。また、行動学試験の後、使用したすべてのマウス脳スライス標本作製し、注射部位を確認する。

4. 研究成果

静脈麻酔薬であり低濃度ケタミンにおける鎮痛メカニズムを明らかにするため、マウスの前帯状皮質のII/III層ニューロンにホールセルパッチクランプ法を用いてシナプス可塑性変化の記録を行った。また、前帯状皮質にマイクロインジェクションすることで行動学的実験も行った。結果は、低濃度ケタミンおよびケタミン代謝物は過分極ヌクレオチドチャンネルを抑制することでシナプス可塑性変化を抑制することが明らかとなった。また、神経障害性モデルにおいてこれらの薬剤は疼痛抑制および不安様行動を抑制することが明らかとなった。以上より低濃度ケタミンは前帯状皮質に作用することで慢性疼痛治療の薬剤となる可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中学
2. 発表標題 マウス前帯状皮質におけるケタミンの鎮痛抑制効果
3. 学会等名 日本整形外科学会 基礎学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------