

# 研究報告書

## 「末梢神経損傷によって誘導される上位中枢神経回路の改編と動作原理」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 宮田麻理子

### 1. 研究のねらい

脳には身体部位に対応して身体感覚を知覚する脳地図が存在する。脳手足を切断するなどして、末梢の感覚神経が切断されると、齧歯類～ヒトまで脳地図が再構築されることが知られている。このような変化は、脳自体がもつ補償能力だが、時として、外界環境との不適合も引き起こすことが知られており、例えば、ヒトでは手足を切断した後に失ったはずの手足があたかも存在するように感じ、激しく痛むという幻肢痛という難治性疼痛には、脳地図の変化が中心的な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、これらは、主に患者を用いた非侵襲的脳機能計測法や、動物モデルの *in vivo* における受容野計測・解剖学的研究が中心であり、神経活動の基盤となるシナプス機能レベル・神経回路レベルの研究は立ち遅れているのが現状である。その主な理由は、中枢神経系の神経回路網の複雑さ故に、入力を特定したシナプス解析が難しいこと、さらには、体部位情報そのものが離れた神経核同士の軸索線維(投射路)上で伝達されるため、*in vivo* 実験が主となり、局所回路レベル上では体部位情報を識別することが出来ないことがあげられる。これらの問題に対し、本申請は、電気生理学的に求心線維のシナプス解析と入力様式の解析が可能な内側毛帯線維—視床 VPM 核投射細胞シナプスを対象に、触感覚の上行性線維である内側毛帯線維を体部位情報別に蛍光蛋白で可視化できる遺伝子改変マウスを独自に作製し、電気生理学的シナプス解析と形態解析を同時に行うことにより、末梢神経損傷によって引き起こされる視床への上行性線維シナプスの改編過程を時空間的に明らかにすることを目的とした。本研究はさらに、局所配線解析、逆行性トレーサーの実験を組み合わせ内側毛帯線維の起始細胞(三叉神経核細胞)を含めた収束・発散の神経回路全体の改編様式を紐解き、その動作原理を明らかにする事により、幻肢痛などの神経損傷による可塑性の神経学的機構を解明することを試みた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

申請者は成獣マウスの髭の感覚を司る感覚神経(三叉神経第二枝)を切断し、独自に開発した脳スライス標本を用いて、中継核である視床(VPM 核)の神経回路を電気生理学的に解析した。通常マウスの VPM 細胞は機能的には一本の上行性神経線維(内側毛帯線維)に支配されている。神経切断をすると、わずか一週間の内に、新たな上行性線維が侵入し、多数の線維によって支配されるように変化した(多重支配、図1)。また損傷後、新たに形成されるシナプス後部には、本来幼若時のみで、成獣には発現していない GluA2 型グルタミン酸受容体が発現しているため、弱くゆっくりとした伝達様式に変化した(図2)。さらに、トレーサーを用いた解剖学的解析から、内側毛帯線維の走行が発散性の神経回路に変化することを見いだした。本研究ではさらに、上行性線維の体部位情報を可視化し、このような視床の局所回路レ

ベルの実験系に、体部位情報を落とし込むことに成功した。遺伝子改変マウスを用いて髭領域由来の内側毛帯線維のみを蛍光蛋白で識別し、その結果、新たに侵入する線維は髭領域以外の脳部位から入力する事が明らかになった(模式図 図 3)。また、内側毛帯線維の改編に先行して、損傷後に持続性抑制性 GABA 電流(tonic GABA 電流)が増強し、改編後は改編されている細胞のみ tonic GABA 電流が増強していた。これら tonic GABA 電流が改編の引き金になる可能性を現在検証中である。そもそも成体の脳では神経回路は極めて安定しているものと考えられ、神経損傷後の早期の脳地図の変化は、回路内の抑制と興奮性のバランスの変容により、潜在する神経回路が顕在化すると考えられていたが、この結果は、従来の考えを覆すものであり、神経回路自体が損傷後早期に改編し、信号伝達の性質も変容する事が明らかになった。これらの成果の一部は J.Neurosci. 32(20) (2012) pp6917-6930.に発表し、プレスリリースにより、日本経済新聞をはじめとする多くのメディアに紹介された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A. 内側毛帯線維シナプスの多重支配化現象機構の解析

神経損傷後わずか一週間で、VPM 細胞への内側毛帯の支配様式が一本化支配から多重支配に変化した(図1)。新たに侵入してくる上行性線維シナプスのシナプス特性は、興奮性シナプス電流も小さく、シナプス電流の減衰時間は長かった。即ち、弱くゆっくりとしたシナプス伝達を行うシナプスが形成され、この性質は本来の内側毛帯線維シナプスの性質(強く速い伝達様式)とは異なるものであった。そこで、新たに侵入してくる線維シナプスの性質を電気生理学と解剖学的手法を用いて詳細に解析したところ、シナプス後部には、本来幼若時の視床でしか発現しておらず、成獣には発現していない GluA2 型グルタミン酸受容体が発現していることを発見した(図 2)。また、内側毛帯線維は損傷後5日目から改編しはじめるが、それより先行して損傷後1日目には、損傷後に持続性抑制電流(tonic GABA 電流)が急激に増強し、7日目では改編されている細胞のみ tonic GABA 電流が増強していた。実際に in vivo の実験でも、神経損傷後は視床が過分極の時に見られるバースト発火を示し、このことから tonic GABA 電流の増加が示唆された。

### 研究テーマ B. 内側毛帯線維の体部位情報の可視化

体性感覚系において、機能的な神経回路の改編と体部位情報との関係性を明らかにすることは、生体における体性感覚情報の処理様式を考える上で極めて重要な課題である。胎生期に三叉神経主知覚核の髭領域のみに発現するプロモータを用いて、遺伝子改変マウスを作製し、髭領域由来の内側毛帯線維だけを蛍光蛋白でラベルすることに成功した。このマウスを用いて、視床の神経改編過程で、髭領域由来と非由来の線維がどのような変化を示すかを観察した。その結果、改編にともない VPM 核では非髭領域由来線維が侵入してくることが明きからになった。

### 研究テーマ C. 多重支配化現象の発散・集束性神経回路の解析

BDAトレーサーを三叉神経主知覚核の髭領域に微量注入し、一本一本の内側毛帯線維の走行、分岐様式を解剖学的に解析した。その結果、機能的改編が見られる一週目では、上行性線維の走行が広く発散性に分岐し、軸索終末は数が減少し終末サイズも減少していることが分かった。この結果は電気生理学的変化とよく合致した。

内側毛帯線維配線変化

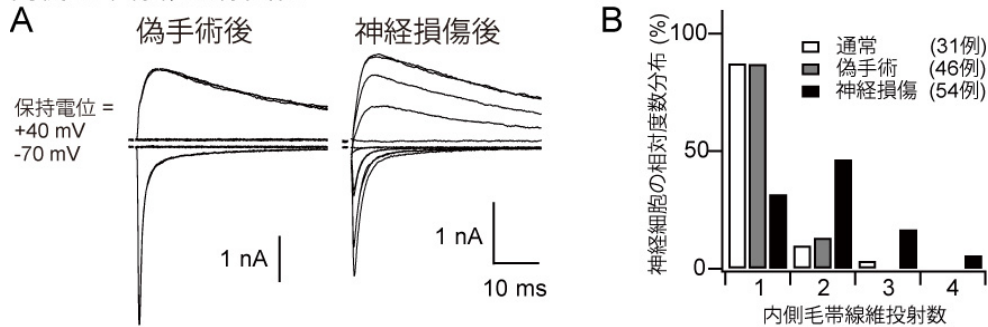


図 1. 末梢神経損傷後の内側毛帯線維投射変化 細胞パッチクランプ法により、視床神経細胞から内側毛帯線維を介するシナプス電流を記録した。神経損傷後には階段状のシナプス電流増加が記録され、複数の内側毛帯線維投射が示唆された。

グルタミン酸受容体発現変化

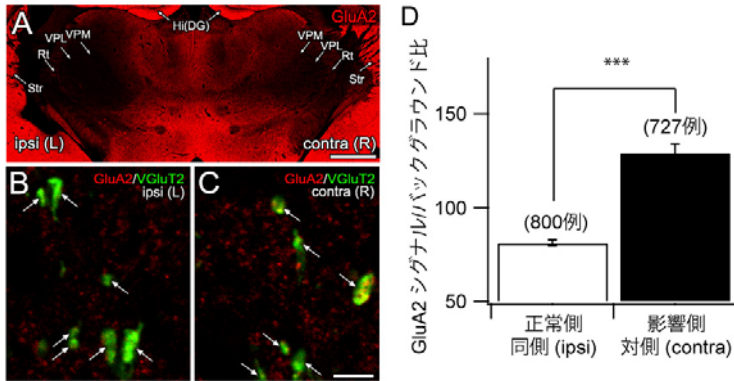


図 2. 末梢神経損傷後の GluA2 受容体発現増加 影響側の視床 (VPM) においては、内側毛帯線維終末の指標分子である VGlut2 と共存する GluA2 の免疫組織化学反応が増加している。

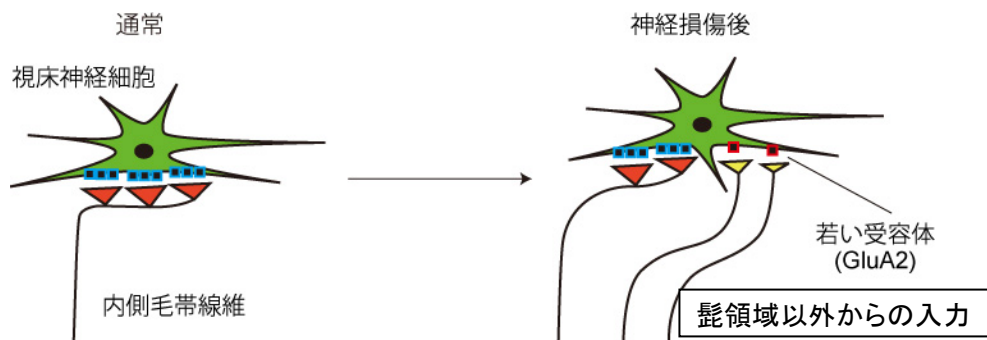


図 3. 末梢神経損傷による視床神経回路つなぎ換え現象の模式図

### 3. 今後の展開

これまでの仮説では、神経損傷後の脳地図変化に関して、神経回路自体が換わるのには数年かかると考えられてきたが、今回の結果から、損傷後極めて早期に、視床では神経回路が改編されることが明らかになった。さらに、その新しく侵入してくる入力は、損傷された部位(髭領域)以外の入力線維であり、即ち、局所回路の改編過程で脳地図が変化していることを示唆する。また、改編されたシナプスに発現する GluA2 は回路改編のバイオマーカーになりうる可能性があり、幻肢痛などの診断やリハビリ治療効果の指標として応用利用できる可能性がある。

今後、Tonic GABA<sub>A</sub> 受容体の発現が、視床回路の改編の引き金になることが証明されれば、損傷後すぐに投薬治療を行い、Tonic GABA<sub>A</sub> 受容体のみを抑制することで、脳地図の再構築を抑制し、幻肢覚・幻肢痛の発症を抑えられる可能性もあり、新たな治療法の開発に繋がるのが期待される。今後は、行動解析も行うことで、神経損傷による神経回路改編の生理学的意味を明確にさせることで、分子—回路—行動までの全体像を明らかにしてゆきたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)申請当時、神経損傷による視床での多重支配化現象を捉えていたこともあり、概ね計画どおり順調に研究を進めることができた。とりわけ、体部位情報を可視化できるマウスを作製したことで、局所回路レベルに、本来 *in vivo* 実験でのみ抽出される体部位情報を落とし込む試みは世界的にも行われておらず、このことにより、局所神経回路の改編の生理的意義が明らかになったことは大きな前進であったと評価する。また、神経回路シナプスを詳細に解析することにより、神経回路改編に特異的な分子 GluA2, Tonic GABA<sub>A</sub> 受容体の発現を発見できた事で、今後の臨床応用に繋がる可能性を提示できた。一方で、多重支配によって VPM 細胞集団の活動性がどのように変化し、受容野がどのように変わるのかは、到達目標には至っておらず、今度のさらなる研究が必要である。分子—神経回路—システムを繋げる研究を目指した本研究は、さきがけにより神経損傷による改編回路の全体像の大枠を解明することができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

脳には身体部位に対応して身体感覚を知覚する脳地図が存在する。脳手足を切断するなどの場合、このような適応性は幻肢痛という難治性疼痛を生むことがある。本研究は、下記のように、蛍光蛋白で可視化できる遺伝子改変マウスを独自に制作し、電気生理学的な手法、局所配線解析・逆行性トレーサー法など解剖学的手法を併用して、この適応性の機構をシナプスレベルで明らかにした。これらの結果は、当該領域の一流国際誌、Journal of Neuroscience に掲載された4報の論文をはじめ、35件の外部発表として公表され、プレスリリースの結果も日本経済新聞をはじめとする多くのメディアで紹介され好評であった。提案された課題は完遂されたと考える。

本研究の内容は次の通りである。成獣マウスの髭の感覚を司る感覚神経(三叉神経第二枝)を切断し、独自に開発した脳スライス標本を用いて、中継核である視床(VPM 核)の神経回路を電気生理学的に解析した。その結果、①神経切断をすると、その回復過程で多重支配が



起こったが、新たに形成されるシナプス後部には、本来幼若時のみに発現する GluA2 型グルタミン酸受容体が発現し、伝達様式も変化した。②遺伝子改変マウスを用いて髭領域由来の内側毛帯線維のみを蛍光蛋白で識別し、体部位マップの変化を可視化した。③求心性入力線維の改編に先行して、損傷後に持続性抑制性 GABA 電流(tonic GABA 電流)が増強し、改編後は改編された細胞のみ tonic GABA 電流が増強した。この tonic GABA 電流が改編の引き金になる可能性を検証中である。これら結果は、神経再生についての従来の考えを覆すものであり、神経回路自体が損傷後早期に改編し、信号伝達の性質も変容する事が明らかになった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

<p>1. Matsumine H., Sasaki R., Takeuchi Y., <u>Miyata M.</u>, Yamato M., Sakurai H.: Vascularized versus non-vascularized island-median nerve grafts in the facial nerve regeneration and functional recovery of rats for facial nerve reconstruction study. <i>J Reconstr Microsurg</i> (2013) online-published . in press .DOI <a href="http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1357270">http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1357270</a></p>
<p>2. Yuichi Takeuchi, Hidetsugu Asano, Yoko Katayama, Yoshihiro Muragaki Keiji Imoto, and Mariko Miyata` Large-scale somatotopic refinement via functional synapse elimination in the sensory thalamus of developing mice. <i>J. Neurosci.</i> accepted</p>
<p>3. Takeuchi Y, Yamasaki M, Nagumo Y, Imoto K, Watanabe M, <u>Miyata M (CA)</u>: Rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice caused by peripheral sensory nerve transaction. <i>J. Neurosci.</i> 32(20) (2012) pp6917-6930.</p>
<p>4. <u>Miyata M</u>, Kishimoto Y, Tanaka M, Hashimoto K, Hirashima N, Murata Y, Kano M, Takagishi Y: A role for myosin Va in cerebellar plasticity and motor learning: a possible mechanism underlying neurological disorder in myosin Va disease. <i>J. Neurosci.</i> 31(16) (2011) pp6067-6078.</p>
<p>5. Nagumo Y, Takeuchi Y, Imoto K, <u>Miyata M (CA)</u> Synapse- and subtype-specific modulation of synaptic transmission by nicotinic acetylcholine receptors in the ventrobasal thalamus. <i>Neuroscience Research</i> 69(3) (2011) pp203-213.</p>

### (2)特許出願

なし。

### (2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

メディア掲載記事等

- ① 特集:2012 年新世代を信じよ。日本を立て直す 100 人 AERA 2012 年 1 月号  
vol.25, No.1

- ② プレスリリース:末梢神経損傷後に生じる脳の中の神経回路の「つなぎ換え」機構を解明 平成24年5月15日
- ③ 「幻肢痛」の仕組み一部解明” 日本経済新聞夕刊および Web 版 (平成 24 年 5 月 16 日)
- ④ 幻肢痛の症状マウスで確認” 東京新聞夕刊(平成 24 年 5 月 16 日)
- ⑤ 「幻肢痛」仕組み一部解明=切断後、早期に神経変化—治療法 時事通信社 (平成 24 年 5 月 17 日)
- ⑥ 神経回路短期間で「つなぎ換え」 日刊工業新聞 (平成 24 年 5 月 25 日)
- ⑦ 末梢神経損傷後に早期神経回路の「つなぎ換え」科学新聞(平成 24 年 5 月 25 日) (平成 24 年 5 月 25 日)
- ⑧ 大人でもニューロンのつなぎ換えは早期に起きる マイナビニュース (Web) (平成 24 年 5 月 17 日)
- ⑨ 末梢神経損傷後に生じる脳の中の神経回路の「つなぎ換え」機構を解明 日経バイオテク ONLINE (Web) (平成 24 年 5 月 17 日)
- ⑩ 特集記事:末梢神経が切断されると、神経回路が速やかにつなぎかえられる！ Nature.japan.jobs (Web) (平成 24 年 7 月 12 日)

学会発表(招待講演のみ抜粋)

- 1. 宮田麻理子(2013.12)機能的シナプス除去による体部位情報の先鋭化  
遺伝研研究会 哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム シンポジスト
- 2. 宮田麻理子(2013.6)Somatotopic refinement via developing synapse elimination in the whisker sensory thalamus of developing mice 埼玉大学・理工学部・脳科学セミナー招待講演(埼玉)
- 3. 宮田麻理子(2013.3)視床内側毛帯線維の競合的ダイナミクス 第 118 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (香川)シンポジウム招待講演
- 4. 宮田麻理子 (2012.7)末梢神経損傷後に生じる脳内神経回路のつなぎ換え機構・ヒューマンサイエンス事業財団 ワークショップ 招待講演
- 5. Miyata Mariko(2011.7)Peripheral nerve injury transection-induced remodeling of the somatosensory thalamus synapses. College de France Neuroscience workshop (Paris) ワークショップ招待講演
- 6. Miyata Mariko, Takeuchi Yuichi (2011.3) Synaptic rewiring and compositional changes in glutamate receptors at thalamic lemniscal synapses in the developmental process. The 88th annual meeting of physiological society of Japan, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回 日本解剖学会総会・全国学術集会(横浜)シンポジスト招待講演