

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500400

研究課題名(和文) 神経損傷後の中枢神経回路の改編を制御する神経活動依存的機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of circuit remodeling after nerve injury

研究代表者

宮田 麻理子(MIYATA, MARIKO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70281631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、視床の触覚核であるVPm核の中継細胞への上行性線維が神経損傷後5日以降に一本支配から多重支配になることを明らかにした。しかし、抑制性入力の変化に不明であった。そこで、本課題では、末梢神経損傷後経日的にVPm中継細胞から抑制性GABA電流を調べた。その結果、手術1日目からシナプスGABA電流は減弱し、一方でシナプス外GABA電流は増加していた。この増加は手術後7日目では多重支配した細胞のみに観られ。さらに、正常動物でVPmにシナプス外GABA受容体のアドニストを投与したところ、多重支配が生じた。したがって、損傷後のシナプス外GABA電流の増加が上行性線維改編を誘導する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The rodent ventral posterior medial (VPm) nucleus receives an excitatory input via the medial lemniscal synapse. In addition, the VPm also receives nearly all of the inhibitory inputs from the thalamic reticular nucleus (TRN). We previously reported that the complete transection of the infraorbital nerve (ION) resulted in multiple innervation of medial lemniscal fibers onto a VPm neuron around 5 days after operation (POD5). However, it remains still unclear the postoperative change of inhibitory input onto VPm neurons after the transection of ION. ION cut reduced the amplitude of evoked-inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs). Interestingly, in contrast, tonic GABA currents onto VPm neurons rapidly increased by the transection of the ION at POD1. At POD7, tonic GABA currents also increased in VPm neurons, which had multiple lemniscal fibers by the transection of ION. Thus, inhibitory input change may interact with the remodeling of lemniscal fibers.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経科学一般

キーワード：視床 抑制系入力 tonic GABA 受容体 内側毛帯線維

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷後に中枢神経系では神経回路の改編や受容野の変化を引き起こすことが知られており、これらは幻肢覚の中心的役割をしていると言われている。四肢切断、脊髄損傷などの求心性経路が遮断されると、その投射先である視床や体性感覚野などの上位中枢において受容野の大きさが変化し、神経軸索走行が変化することから、上位中枢においても大規模な神経回路の書き換え(再編成)が生じると考えられている(Merzenichら, *J. Comp. Neurol.* 1984; Ponsら, *Science* 1991; Jones & Pons, *Science* 1998; Kaasら, *Exp. Neurol.* 2008)。こうした神経回路の再編成は、脳障害後の代償機能や、幻肢痛などの異常感覚にも深く関与すると考えられ、その機構の解明は、脳機能回復に向けた新たな治療・リハビリ法の開発に極めて重要である(Florら, *Nature* 1995; Davisら, *Nature* 1998; Lotzeら, *Brain* 2001)。

これら求心性入力遮断後の急性期では上位中枢神経細胞自身の神経活動が変化することが示唆されている。例えば、末梢感覚神経損傷後に視床や大脳皮質で、GABA 濃度が数分以内に減弱する事や(Levy. et al., *Ann. Neurosci* 2002)、感覚神経損傷後の視床において、胎児型ナトリウムチャンネル(Nav1.3)が発現し、視床の神経活動が亢進する(Hains et al., *Brain*, 2005)ことが報告されている。このような急性期での活動性の変化は、受容野のUnmasking 現象に関与すると考えられている。しかしながら、神経損傷による中枢神経系の興奮性抑制性の変化が、その後引き起こされるであろう神経回路自身の改編にどのような影響を与えているかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が発見した、眼窩下神経の切断によって誘導される内側毛帯線維-視床VPm 核投射細胞シナプスの多重支配化現象(後述参照)をモデルに、内側毛帯シナプスのシナプス後部にあたる視床 VPm 細胞への興奮性と抑制性の変化に着目し、とりわけ抑制性入力の変化が多重化現象にどのような影響を与えるかを解明する。

3. 研究の方法

- 1) 内側毛帯シナプスの成熟が完了した(P21以降)成獣マウスにおいて、髭の感覚を支配している三叉神経第二枝(眼窩下神経)を麻酔下で切断する。
- 2) 術後経日的にマウスの視床スライスVPm 核からパッチクランプ記録をとり抑制性入力変化を解析する。
- 3) これにより、眼窩下神経切断後のVPm 核の抑制性入力の経時的变化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 末梢神経損傷後の視床中継細胞における抑制性入力変化

体性感覚視床(VPM)の中継細胞は、発達初期時に複数の求心性内側毛帯線維で支配されているが、生後3週では発達期間中のシナプス除去過程を経ることで、ほぼ全てのの中継細胞が1本の強力な内側毛帯線維によって支配されるようになる。しかしながら、ひげ感覚を上位中枢へ伝達させる三叉神経の第2枝(眼窩下神経:IONC)を完全切断すると、神経切断後5日目から、中継細胞が再び生後発達期に見られるような複数の内側毛帯線維で支配される神経回路構造へ再改編される(Takeuchi et al., *J. Neurosci.* 2012 図1)。視床VPM核への抑制性入力は視床網様体核からすべて入力をうける。この抑制入力がかどのように変化するかを眼窩下神経損傷後から経日的に視床スライスを作成し、網様体核に最小刺激をすることで、視床VPM細胞からホールセルパッチクランプを行い、IPSCを記録した。視床神経切断後の急性期では、約70%の細胞で、VPMの中継細胞のシナプス性GABA電流の減弱が観られた(図2)。一方で、ピククリンを外液投与で観察される内因性シナプス外GABA電流の増加や、シナプス外GABA_A受容体の作動薬投与によってシナプス外GABA電流が増加していることが明らかになった(図4)。またこれらは、内側毛帯線維の再改編に先行して誘導されることが明らかになった。また、これらのGABAシナプス電流の変化は、切断6日以後、内側毛帯線維の再改編を受けた中継細胞で特異的に認められることも明らかにした。

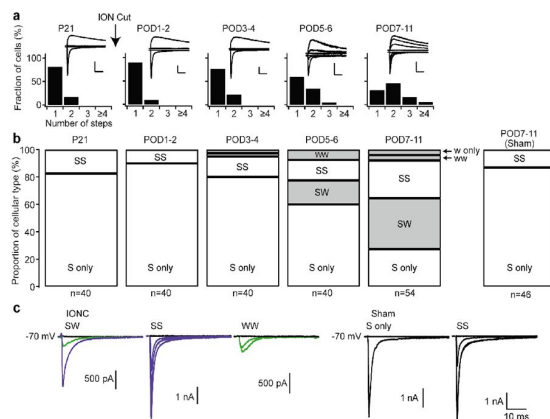


図1 神経損傷によるVPM細胞への内側毛帯線維支配の多重化

(2) 低下したシナプスGABA電流の特性

シナプスGABA電流の低下の特性がシナプス後部の変化かシナプス前部の変化かを調べるために、paired pulse ratioを測定した。結果、これらは手術前も手術後も変化なく、振

幅だけが変化することから、シナプス後部の受容体の変化であることが推定された。そこで、ストロンチウムを外液に投与し、最小刺激の際に視床 VPM 細胞で得られる素量の IPSC を観察した。その結果、素量振幅は低下したが、発生頻度には変化がなく、従って、シナプス前部の GABA 放出量の変化ではなく、後部の GABA_A 受容体数が減少していることが推測された。それと同時に、減衰時間も延びていることが分かった(図3)。

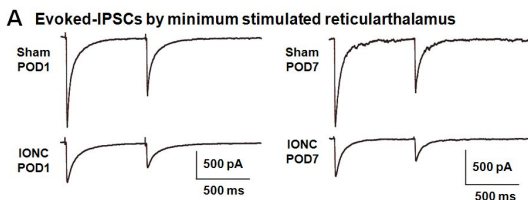


図2 シナプス GABA 電流の低下
シナプス GABA 電流が IONC 後低下している

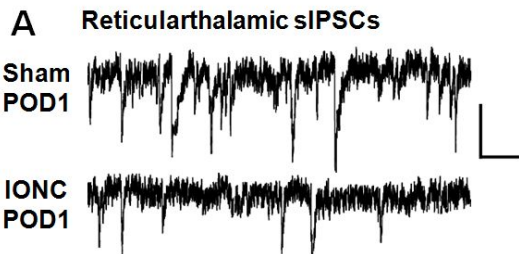


図3 素量シナプス GABA 電流の低下

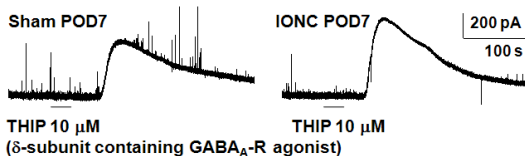


図4 神経損傷後シナプス外 GABA 電流の増加

(3) GABA_A 受容体作動薬による視床回路改編

シナプス外 GABA_A 電流の増加を受け、その電荷増加影響が大きいと考えられたため、GABA_A 電流の増加が内側毛帯改編を誘導するのではないかと仮説をたてた。そこで、シナプス外 GABA_A 受容体の作動薬を正常マウスの VPM 核へ浸透圧ミニポンプで持続処置し、その後視床スライス標本にして、内側毛帯線維支配様式をパッチクランプ法で観察した。結果、シナプス外 GABA_A 受容体の作動薬を正常マウスの VPM 核へ持続処置すると、内側毛帯線維の再改編が誘導されることも明らかにした。この様に、一連の GABA シナプス伝達の変化は、視床細胞の活

動性や神経切断後の内側毛帯線維の再編成現象を誘導する一因になっている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

Matsumine Hajime †, Takeuchi Yuichi, Sasaki Ryo, Sakurai Hiroyuki, Miyata Mariko, Yamato Masayuki* : Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plastic and reconstructive surgery* : 00, 2014.3

Matsumine Hajime †, Sasaki Ryo, Takeuchi Yuichi, Miyata Mariko, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Sakurai Hiroyuki : Vascularized versus non-vascularized island-median nerve grafts in the facial nerve regeneration and functional recovery of rats for facial nerve reconstruction study. *Journal of reconstructive microsurgery* 30 (2) : 127-136, 2014.2

Ohtani Yoshiaki †, Miyata Mariko* (Co first author), Hashimoto Kouichi, Tabata Toshihide, Kishimoto Yasushi, Fukaya Masahiro, Kase Daisuke, Kassai Hidetoshi, Nakao Kazuki, Hirata Tatsumi, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu, and Aiba Atsu*. : Synaptic targeting of mGluR1 by carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (7) : 2702-2712, 2014.2

Takeuchi Yuichi †, Asano Hidetsugu, Katayama Yoko, Muragaki Yoshihiro, Imoto Keiji, Miyata Mariko* : Large-scale somatotopic refinement via functional synapse elimination in the thalamus of developing mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (4) : 1258-1270, 2014.1

Takeuchi Yuichi †, Yamasaki Miwako, Nagumo Yasuyuki, Imoto Keiji, Watanabe Masahiko, Miyata Mariko* : Rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice caused by peripheral sensory nerve transection. *The Journal of*

Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32 (20) : 6917-6930 , 2012.5

Miyata M†, 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. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31 (16) : 6067-6078 , 2011.5

宮田麻理子 鳴島 円 : シナプス特性から観た皮質視床路の役割. Clinical Neuroscience 31 (1) : 38-41 , 2013.1

Miyata Mariko†*, Takeuchi Yuichi : 「身体地図のリモデリング」. Clinical Neuroscience 29 (8) : 885-889 , 2011

〔学会発表〕(計 15 件)

Narushima Madoka, Miyata Mariko : Cortical feedback activity regulates connection pattern of afferent lemniscal synapses in the somatosensory thalamus. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan, 2014/03

Takeuchi Yuichi, Katayama Yoko, Miyata Mariko : Transection of the whisker sensory nerve reorganizes topographical wiring of afferent fibers in the whisker sensory thalamus of mice. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Kagoshima, Japan, 2014/03

宮田麻理子 : 機能的シナプス除去による体部位情報の先鋭化. 国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」, 三島、日本, 2013/12

竹内雄一, 宮田麻理子 : 生後発達期マウス視床におけるシナプス刈り込みは体性局在地図の先鋭化を担う. 日本生理学会若手の会, 東京, 日本, 2013/08

Takeuchi Yuichi, Miyata Mariko : Somatotopic tuning along with synapse elimination in the whisker sensory thalamus of developing mice. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan, 2013/06

Nagumo Yasuyuki, Miyata Mariko : Phasic-GABA current in thalamic relay neurons is reduced by peripheral nerve injury, whereas tonic-GABA current is increased. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society

(Neuro2013), Kyoto, 2013/06

宮田麻理子 : 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. さきがけ 脳情報の解釈と制御領域 平成25年度 成果報告会, 東京 日本, 2014/01

Madoka Narushima1, Motokazu Uchigashima2, Kouichi Hashimoto3,4, Atsu Aiba5, Masahiko Watanabe2, Mariko Miyata1,4 and Masanobu Kano6 : Requirement of type 1 metabotropic glutamate receptor for experience-dependent remodeling of mouse retinogeniculate synapses. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan, 2012/09

Yuichi Takeuchi, 1, Mei Uchida, 1, Mariko Miyata : Structural changes of lemniscal axon terminals after the peripheral sensory nerve transection of mice. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan, 2012/09

Mariko Miyata : The remodeling of thalamic synapses and behavior changes after the peripheral nerve injury. 8th FENS meeting, Barcelona, Spain, 2012/07

宮田麻理子 : 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, 2013/03

Takeuchi Yuichi, Miyata Mariko : Information tuning via synapse elimination in the whisker sensory thalamus of developing mice. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, 2013/03

Nagumo Yasuyuki, Miyata Mariko : Contrary changes of phasic- and tonic-inhibition onto thalamic relay neurons in mice with infraorbital nerve cut. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, 2013/03

Takeuchi Yuichi, Uchida Mei, Miyata Mariko : Structural changes of lemniscal axon terminals after the peripheral sensory nerve transection of mice. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2012/09

竹内雄一, 内田萌衣, 宮田麻理子 : 末梢感覚神経切断による視床内求心性線維のリモデリング. 日本生理学会若手の会, 東京、日本, 2012/06

〔図書〕(計 1件)

宮田麻理子：末梢神経損傷により生じる早期の中枢神経回路の「つなぎ換え」現象 - 幻肢痛発症の解明の手がかりへ - . 科研費ニュース 4 : 13-14 , 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮田麻理子(MIYATA, MARIKO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70281631