

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290010

研究課題名(和文)体性感覚系中枢神経回路の機能的改編による体部位情報の変容動態

研究課題名(英文)Body map reorganization by remodeling of neural circuit in CNS

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) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路のダイナミックな機能的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。本申請で我々は体性感覚野視床核に入力するヒゲ由来の内側毛帯線維を可視化することで、発達期、およびヒゲ神経損傷における視床のヒゲ領域での体部位情報の改編と機能的な回路改編の関係性を調べた。その結果、電気生理的解析による機能的回路改編が生じると同時に解剖学的にも体部位情報が改編された。即ち、発達初期および神経損傷後は機能的回路改編とともに、視床のヒゲ領域に頸、下顎部位からの入力線維の終末が存在していた。受容野も解剖学的変化と同様に拡大し変化した。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits in the somatosensory system are remodeled during development and/ or by peripheral nerve injury. However, the link between local circuit remodeling and somatotopic reorganization remains unclear. In the present study, we discovered that remodeling of lemniscal fibers (excitatory afferent fibers in the somatosensory thalamus) caused by transection of the primary whisker sensory nerve actually mediated somatotopic reorganization with highly correlated anatomical remodeling and functional rewiring. Specifically, lemniscal fibers carrying genetically visualized whisker-specific information significantly retracted from the whisker sensory thalamus after the transection, whereas those not carrying whisker information ectopically invaded the whisker sensory thalamus.

研究分野：神経科学

キーワード：視床 改編 内側毛帯線維 体部位情報

1. 研究開始当初の背景

体性感覚系の体部位情報は、「投射の法則」によって体部位マップを保ちながら伝達される。例えば、齧歯類の髭の触覚情報は、三叉神経核 視床 VPm 核 一次体性感覚野にかけて、バレット バレロイド バレルと呼ばれる髭に対応したマップを介して伝えられる。一方、マップを構成する神経回路は、幼若期には未熟なシナプスを過剰に形成しているが、臨界期と呼ばれる発達時期に、必要なシナプスは強化され、不要なシナプスは弱化・除去され(シナプスの選択的強化と除去) 成熟した神経回路に改編される (*Wong and Lichtman in Fundamental Neuroscience 2nd ed.*)

我々は、マウス VPm 核において、三叉神経核由来の求心性線維(内側毛帯線維) -VPm 細胞(投射ニューロン) シナプスの発達期シナプス除去について研究してきた。単一 VPm 細胞からホールセルパッチ記録をとり、内側毛帯線維束の刺激強度を次第に上げてゆくと、幼若期では内側毛帯線維のシナプス電流応答 (EPSC) が複数のステップで記録されるが(多重支配)、生後第二週目にかけてステップ数が減り、生後三週目までには all or none の 1 ステップになる(一本支配)。このことから、内側毛帯線維 VPm 細胞シナプスは、発達期にシナプス除去が起きると考えられている

(*Arsenault et al. J. Physiol.* 2006, *Takeuchi et al J. Neurosci.* 2013 minor revision)。また、申請者らは昨年、成獣マウス三叉神経第二枝(髭領域の感覚神経)を切断すると、わずか一週間以内

に、VPm 細胞への内側毛帯線維の支配様式が一本支配から多重支配になる現象(再多重化現象)を見いだした (*Takeuchi et al., J. Neurosci.* 2012)。しかし、このような機能的なシナプス除去や、損傷による神経回路の改編が、実際の体部位情報とどのような対応関係にあるかは、全く明らかになっていない。幼若期齧歯類の VPm 細胞は、バレロイド形成を終えた後も顔面支配領域を超えた広い受容野をもち、発達にともない狭くなることが報告されている (*Nicolelis et al., Brain Res.* 1991) が、これらとシナプス除去がどのような関係にあるかも不明のままである。

2. 研究の目的

神経回路のダイナミックな機能的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が、この解明のためには、従来法によるトレーサーを用いた神経回路の可視化では限界があり、神経回路の体部位情報を特異的に標識できる何らかの手段が必要である。そこで申請者は、マウスの体性感覚の中継路である三叉神経主知覚核 (PrV) で発生期に顔面マップを特異的に発現する転写因子に着目し、これらをプロモータとして Cre リコンビナーゼを発現するマウスを用いて、電気生理学と分子生物学的手法、解剖学的手法を組み合わせることにより、機能的神経回路改編と体部位情報との対応関係を明らかにする。また、これらの体部位情報の改編が機能的に大脳皮質体性感覚野でどのように表現されるかを明らか

にする。

### 3. 研究の方法

齧歯類の顔面の触感覚は、三叉神経を伝わり、PrV を起始核とする内側毛帯線維を介して視床 VPm 細胞（投射ニューロン）に伝えられ、最終的に一次体性感覚野に達する。PrV は、顔面マップに対応して、頭部～眼領域、髭領域、下顎領域のマップがあり、それぞれに三叉神経第一枝、二枝、三枝が入力する。この三領域の PrV ニューロンで発現する転写因子が異なり、三叉神経第二枝（髭領域）第三枝（下顎領域）の入力を受ける PrV ニューロンはそれぞれ Krox20, R2 転写因子を発現する (Oury, F. et al. Science 2006)。これに注目し、Krox20, R2 の Cre マウス (Krox::Cre, R2::Cre ; Oury, F. et al. Science 2006) を用いて、Cre-loxP システムを駆使すれば、髭および下顎領域の PrV からの内側毛帯線維を蛍光タンパク質で特異的に可視化した。

具体的にはマウスの髭領域由来の内側毛帯線維を可視化するため、Krox20::Cre と Cre 依存的に蛍光蛋白 (td-tomato) を発現するレポーターラインマウス (Ai14) を交配したマウス (Krox20-Ai14) を作製する。このマウスの視床バレロイド領域で、内側毛帯線維終末のマーカである VGluT2 と共染色することにより、髭領域由来のシナプス終末 (td-tomato 陽性) とそれ以外の終末とを識別し、内側毛帯線維の発達期シナプス除去や末梢神経損傷による再多重化現象によって、体部位情報がどのように変容してゆくかを電気生理学と解剖学的実験を組み合わせで解析した。さらに、単一 VPm 細胞を支配する受容野を *in vivo* 実験でしらべた。また、VPm

細胞上での体部位情報の改編により大脳皮質体性感覚野でどのように表現されているかを明らかにするため、内因性シグナル饒辺かを観察し、顔面マップ特異的な Krox20 で内側毛帯線維にチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させ光刺激して、皮質で記録をとることで、皮質での体部位情報処理の変化を観察した。

### 4. 研究成果

眼窩下神経由来 (三叉神経第二枝由来 PrV2) の内側毛帯線維が tdTomato でラベルされた遺伝子改変マウスを作成し、解剖学的解析法を確立する目的で、内側毛帯線維シナプスの発達段階とりわけ発達期シナプス除去時期に、体部位情報がどのように改編するのかを観察した (Krox20-Ai14)。その結果、シナプス除去期前では、バレロイド構造が完成されていても、そこには、肩領域や三叉神経第三枝領域由来の内側毛帯線維がバレロイド内 VPm 細胞にシナプス結合しており、体部位情報は混在していた。機能的シナプス除去にもなって、他の領域由来の線維終末は優位に除去され、PrV2 領域の終末が積極的に残り、機能的シナプス除去期に large-scale の体部位情報が先鋭化されることが分かった。この実験により、sub cellular level での解剖学的解析法を確立した。

ついで、成獣における眼窩下神経切断実験を行った。切断後一週間後に視床における線維終末の分布を観察した。その結果、神経損傷を起こすと、視床の体部位局在があった線維終末が崩れ、異所性線維終末が侵入してくることが分かった。即ち、ヒゲ領域に第3枝の下顎領域や頸などの領域からの異所性シナプス終末が侵入し、解剖学的体部位情報が改

編されることが明らかになった。

この解剖学的データをもとに、in vivo 細胞外記録法による視床 VPM 核での受容野をしらべた。単一投射細胞の有する受容野は通常極めて狭いが、神経損傷を行うと、異所性シナプスの起始核と同じく、頸や下顎などの受容野を有していた。このことから機能的にも体部位情報が改編されたと考えられた。

さらに、in vivo において神経損傷によって、体部位情報や痛み情報が脳皮質でどのように表現されているかをしらべた。そのため、内因性シグナルを用いた in vivo イメージングシステムを立ち上げ、マウスのヒゲ感覚神経損傷により脳皮質の dysgranular 領域が活性化することを観察した。この領域が痛覚受容に関連した領域であることを証明するため、疼痛誘発物質であるカプサイシンをヒゲパッドに注射し、脳皮質の当該領域が活性化するのかを神経活動の活性化マーカーである c-Fos の発現により調べた。

その結果、dysgranular 領域の第 4 層で c-Fos の発現が上昇していることが分かった。このことはヒゲ感覚神経損傷によって活性化される dysgranular 領域が痛覚受容に関与していることを示している。

また、感覚入力の失われた経路の中核側がどのように変化するのかを経時的に観察するため、三叉神経主知覚核とその求心性線維である内側毛帯線維に ChR2 を発現したマウスを作成し、in vivo において内側毛帯線維を選択的に光刺激することで、末梢神経損傷時に脳皮質においてヒゲ感覚領域がどのように変化・退縮するのかを観察した。従来は、ヒゲ感覚領域を損傷すると脳皮質ヒゲ感

覚領域（パレル皮質）の活動は低下し、領域が縮小すると考えられていた。しかし、実験結果では、ヒゲ感覚領域の退縮は観察されず、活動が維持されていることが分かった。

#### 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 10 件)

Madoka Narushima, Motokazu Uchigashima, Yuki Yagasaki, Takeshi Harada, Yasuyuki Nagumo, Naofumi Uesaka, Kouichi Hashimoto, Atsu Aiba, Masahiko Watanabe, Mariko Miyata and Masanobu Kano : The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. *Neuron* 91 (5) : 1097-1109 , 2016.9 査読あり

Yuichi Takeuchi, Hironobu Osaki, Yuki Yagasaki, Yoko Katayama, Mariko Miyata : Afferent fiber remodeling in the somatosensory thalamus of mice as a neural basis of somatotopic reorganization in the brain and ectopic mechanical hypersensitivity after peripheral sensory nerve injury. *eNeuro* 4 (2) : 0345-16 , 2017.3 査読あり

Mariko Miyata : Changing times, Changing Gender Roles, Who Do We Want Female Researcher to be. 「女前の研究者になるために」. *Acta Anatomica Nipponica* 90 (4) : 27-28 , 2015.9 査読あり

Niimi Yosuke, Matsumine Hajime, Takeuchi Yuichi, Sasaki Ryo, Watanabe Yorikatsu, Yamato Masayuki, Miyata Mariko, Sakurai Hiroyuki : Effectively Axonal-supercharged Interpositional Jump-Graft with an Artificial Nerve Conduit for Rat Facial Nerve Paralysis. *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 3 : e416 , 2015.6 査読あり

Takeuchi Y, Asano H, Katayama Y, Muragaki Y, Imoto K, Miyata M. : Large-scale somatotopic refinement via functional synapse elimination in the thalamus of developing mice. *J*

Neurosci 34 1258-1270 2014. 査読あり

6Matsumine H, Sasaki R, Takeuchi Y, Miyata M, 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. J Reconstr Microsurg. 30 127-136 2014 査読あり

Hajime Matsumine, Ryo Sasaki, Yuichi Takeuchi, Yorikatsu Watanabe, Yosuke Niimi, Hiroyuki Sakurai, Mariko Miyata, Masayuki Yamato: Unilateral multiple facial-nerve branch reconstruction using "end-to-side loop graft" supercharged by hypoglossal nerve. Plastic and Reconstructive Surgery-Global Open (PRS-GO) 2 : e240 , 2014.10 査読あり

Ohtani Y, Miyata M, Hashimoto K, Tabata T, Kishimoto Y, Fukaya M, Kase D, Kassai H, Naoko K, Hirata T, Watanabe M, Kano M, and Aiba A. : Synaptic targeting of mGluR1 by carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function. J Neurosci 34:2702-2712, 2014 査読あり

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 134 (4) : 686-697 , 2014.10 査読あり

Sasaki Ryo, Matsumine Hajime, Watanabe Yorikatsu, Takeuchi Yuichi, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Miyata Mariko, Ando Tomohiro: Electrophysiological and functional evaluations of regenerated facial-nerve defect with a tube containing dental pulp cells in rats. Plastic and reconstructive surgery 134 (5) : 970-978 , 2014.11 査読あり

〔学会発表〕(計 36 件)

〔図書〕(計 1 件)

尾崎弘展, Miyata Mariko : 一次体性感覚野の変容過程. Clinical Neuroscience 163-5. 中外医学社, 東京都、日本, 2017.2 査読あり

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/physiol1/>

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

(3) 連携研究者

竹内雄一 (Takeuchi Yuichi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70588384