

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19195

研究課題名(和文)末梢神経損傷による視床シナプス外部GABA電流の変化と視床神経回路改編への影響

研究課題名(英文) Changes in thalamic extrasynaptic GABA-A receptor-mediated currents following peripheral nerve injury and its influence on the remodeling of thalamic afferent fibers

研究代表者

南雲 康行 (NAGUMO, Yasuyuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：00459661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：末梢感覚神経の損傷は、中枢神経回路を機能的・構造的に再改編させるが、その分子基盤は未だ不明である。本研究では、眼窩下神経切断マウスを用い、求心性内側毛帯線維の再改編を受ける視床細胞において選択的にシナプス外 GABA-A 受容体電流が増加し、この増加が、求心性内側毛帯線維の再改編とマウス下顎領域における異所性痛覚過敏反応誘導の一因になることを明らかにした。以上の結果は、眼窩下神経切断によるシナプス外 GABA-A 受容体電流の増加が、眼窩下神経の支配領域外から新たに内側毛帯線維を動員して神経回路の再改編を誘導することで、末梢からの体性感覚情報入力を補正していると推察している。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve injury induces functional and structural remodeling of neural circuits along the somatosensory pathway, and this remodeling is thought to underlie ectopic abnormal sensation. However, molecular mechanism of injury-induced remodeling is largely unknown. We have previously reported the transection of the infraorbital nerve remodels excitatory lemniscal fiber synapses to somatosensory thalamic neurons. Here we found that extrasynaptic GABA-A receptor (GABA-A R)-mediated currents in the thalamic neuron were potentiated soon after the transection before the remodeling. Pharmacological potentiation of thalamic extrasynaptic GABA-A R currents in intact mice induced the similar abnormal remodeling. Notably, conditional knockout of extrasynaptic GABA-A Rs in the thalamus rescued the injury-induced remodeling as well as the ectopic mechanical hypersensitivity. Together, our results uncover a molecular basis of neural remodeling in the thalamus after peripheral nerve injury.

研究分野：神経生理、神経薬理

キーワード：脳・神経 体性感覚視床 末梢神経損傷 GABA シナプス 内側毛帯線維 神経回路再改編 痛覚過敏反応

1. 研究開始当初の背景

四肢切断などの末梢神経障害や脊髄損傷による求心路遮断は、体性感覚視床領域 (VPM 核) で神経回路を大規模に再改編し、受容野の再構成を誘導する。こうした神経回路の再改編は、幻肢痛などの難治性疼痛の神経回路変更状態に類似した点が多く、中枢神経系における再改編機構の解明は、難治性疼痛や脳機能そのものの回復へ向けた治療方針の確立に重要となる。しかしながら、依然として神経回路再改編機構の詳細に不明な点が多く、特にシナプスレベルにおける生理学的な分子基盤解析研究は非常に少ない。

申請者は、これまでに、眼窩下神経 (三叉神経第二枝) を切断したモデルマウスにおいて、幻肢痛時に類似した体性感覚視床における神経回路の再改編をこれまでに明らかにしてきた。通常、VPM 細胞は、幼若期に複数の求心性内側毛帯線維で支配 (多重支配) されるが、生後発達に伴う活動依存的なシナプス除去により、生後 21 日目には一本の強力な内側毛帯線維で支配 (一本化支配) される神経回路へ成熟する。しかしながら、この成熟神経回路は、眼窩下神経の切断により、切断後 5 日目にはあたかも幼若期の様な複数の内側毛帯線維による多重支配構造 (再多重支配) へ再改編される (Takeuchi et al., *J. Neurosci.* 32:6917-6930, 2012)。

近年、抑制性 GABA シナプスを中心としたシナプス入力の変化に伴い、ポストシナプス細胞活動が、シナプス前終末の除去過程や軸索分枝の変化などによる神経回路の改編機構に影響を与えることが明らかになっている。GABA シナプスでは、シナプスおよびシナプス外部にサブユニット構成の異なる GABA_A 受容体が発現するため、シナプス部電流 (phasic GABA_A 受容体電流) とシナプス外部電流 (tonic GABA_A 受容体電流) をそれぞれ特性の異なる電流として電気生理学的に記録分けすることが出来る。申請者は、これまでに、上述した眼窩下神経切断による回路改編モデルを用い、眼窩下神経切断後 1-3 日目より、視床網様核 (RTN) から VPM 細胞に入力する phasic GABA_A 受容体電流が減弱する一方で、tonic GABA_A 受容体電流は増強することを認め、特に tonic GABA_A 受容体電流の増加が、VPM 細胞内への抑制性電荷 (Cl⁻) 流入量の著明な増加に起因した細胞発火頻度の著明な減弱を誘導させることを明らかにした。興味深いことに、こうした tonic GABA_A 受容体電流の増加は、上述する眼窩下神経切断に伴う求心性内側毛帯線維の再多重支配化の前に誘導され、さらに tonic GABA_A 受容体電流の増加が、内側毛帯線維の再改編を受けた VPM 細胞において選択的に認められる事も明らかにしてきた。これらの結果は、眼窩下神経切断後早期から生じる tonic GABA_A 受容体電流の増強が、内側毛帯線維の再改編を誘導する要因にな

っている可能性を示唆する。また、近年では、眼窩下神経切断時において、眼窩下神経の支配領域に隣接する部位、特に下顎領域において異所性のアロディニア様痛覚過敏症状が誘導され、こうした異所性痛覚過敏症状の形成は、内側毛帯線維の再改編に時期を同じくすることも明らかになっている。こうした背景から、申請者は、眼窩下神経切断時における tonic GABA_A 受容体電流の増加と内側毛帯線維の再改編および異所性痛覚過敏の因果関係について研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、眼窩下神経切断における VPM 核の求心性内側毛帯線維再改編機構の分子基盤を解明することを目的とし、眼窩下神経切断による VPM 細胞での tonic GABA_A 受容体電流の増加と求心性内側毛帯線維の再改編との因果関係について、神経薬理学的あるいは遺伝子工学的技法を導入して電気生理学的に検討した。また、眼窩下神経切断による求心性内側毛帯線維の再改編は、脳内体性感覚地図の変化の基盤になり、切断神経の支配領域に隣接する下顎領域での異所性痛覚過敏反応を誘導する可能性も示唆される。そこで本研究では、この眼窩下神経切断による下顎領域異所性痛覚過敏反応に対し、VPM 核 tonic GABA_A 受容体電流の変化が影響を及ぼすか否かについても検討するため、遺伝子工学技法と動物行動試験により評価した。

3. 研究の方法

内側毛帯線維が一本化に成熟する生後 21 齢で、C57BL/6 マウスの左側眼窩下神経を深麻酔下にて完全切断した。視床 VPM 細胞における GABA シナプス入力の電気生理学的解析は、右脳の VPM 核を含む horizontal 脳スライス切片を作製し、膜電位固定法にて術後翌日から継日的に記録した。Tonic GABA_A 受容体電流の薬理的増強では、シナプス外 GABA_A 受容体作動薬を充填した浸透圧ミニポンプを用いて、生後 21 齢の正常マウスの VPM 核へ慢性持続処置し、内側毛帯線維の改編動態を電気生理学的に検討した。遺伝子工学技法による VPM 核におけるシナプス外 GABA_A 受容体の conditional knockout では、α4 サブユニット遺伝子座に loxP 配列が組み込まれた floxed 型遺伝子改変マウス (Gabra4 floxed マウス) を用い、生後 14 日目において iCre 発現 lentivirus ベクターを VPM 核へ処置し、Cre-loxP 反応を介して受容体の発現を欠損させた。同マウスは、lentivirus ベクター処置 7 日後 (生後 21 日齢) にて、眼窩下神経の切断術を受け、VPM 核を含む脳スライス切片を用いた電気生理学試験により、眼窩下神経切断による内側毛帯線維再改編へのシナプス外 GABA_A 受容体の conditional knockout の影響検討に用い

られた。また lentivirus ベクターを処置した一部のマウスは、下顎領域異所性痛覚過敏反応への影響を検討するため、神経切断前および切断後 4-5 日目において von Frey 式痛覚測定試験に用いられた。

4. 研究成果

眼窩下神経切断マウスにおける内側毛帯線維の再改編を受けた VPM 細胞では、tonic GABA_A 受容体電流の増強が認められる。通常、視床シナプス外 GABA_A 受容体は、 $\alpha 4$ および δ サブユニットを必須構成サブユニットとして、GABA_A 受容体を構築している。そこで申請者は、まず初めに、眼窩下神経切断における $\alpha 4$ サブユニットの発現変化について免疫染色法により検討した。その結果、眼窩下神経切断マウスにおける VPM 核では、対照群と比較して、 $\alpha 4$ サブユニット陽性 puncta の著明な増加が認められた。この結果は、眼窩下神経切断マウスにおける VPM 細胞 GABA シナプス外部では、シナプス外 GABA_A 受容体の発現増加により、tonic GABA_A 受容体電流が増加していることを示唆している。そこで次に、tonic GABA_A 受容体電流の増加を模倣するため、シナプス外 GABA_A 受容体作動薬 (THIP) を皮下埋め込み式の浸透圧ポンプにより正常マウス VPM 核へ持続投与し、内側毛帯線維の改編動態を電気生理試験で解析した。その結果、正常マウス VPM 核への 1 週間持続的な THIP 処置は、対照群 (saline 処置群) と比較して、眼窩下神経切断時に認められる様な内側毛帯線維の再多重化を誘導することが明らかになった。さらに、 $\alpha 4$ サブユニット遺伝子座に loxP 配列が組み込まれた floxed 型遺伝子改変マウス (Gabra4 floxed マウス) を用い、P14 にて VPM 核へ iCre 発現 lentivirus ベクターを処置することで、眼窩下神経切断による内側毛帯線維再改編への tonic GABA_A 受容体電流の conditional knockout の影響についても同様に検討した。その結果、眼窩下神経切断前に lentivirus ベクターによる tonic GABA_A 受容体電流の conditional knockout を行うと、内側毛帯線維の再改編現象が抑制されることが明らかになった。これらの結果は、眼窩下神経切断による VPM 細胞での内側毛帯線維再改編が、tonic GABA_A 受容体電流の増加に起因して誘導されることを示唆する。

最近、眼窩下神経の切断が、眼窩下神経の支配領域に隣接する部位、特に下顎領域において異所性のアロディニア様痛覚過敏症状を誘導することが明らかになり、こうした異所性痛覚過敏症状の形成は、内側毛帯線維の再改編に時期を同じくする。そこで、申請者は、眼窩下神経切断による下顎領域での異所性痛覚過敏反応へのシナプス外 GABA_A 受容体の conditional knockout の影響について検討した。正常マウスにおける眼窩下神経の切断

は、切断後 4-5 日目において、下顎領域における著明な異所性痛覚過敏反応を誘導する。しかしながら一方で、こうした眼窩下神経切断に伴う下顎領域での異所性痛覚過敏反応は、Gabra4 floxed マウスの VPM 核へ iCre 発現 lentivirus ベクターを処置し、シナプス外 GABA_A 受容体を conditional knockout させることにより有意に抑制された。これらの結果は、眼窩下神経切断による VPM 細胞での tonic GABA_A 受容体電流の増加が、下顎領域における異所性アロディニア様痛覚過敏反応の形成に参与していることを示唆する。

以上本研究の結果より、眼窩下神経切断による VPM 細胞 tonic GABA_A 受容体電流の増加は、内側毛帯線維の新規動員に伴う求心性線維再多重化の引き金となり、それに連動する脳内体性感覚地図の変化の基盤になる可能性が示唆された。さらに、眼窩下神経切断による VPM 核 tonic GABA_A 受容体電流の増加は、下顎領域における異所性のアロディニア様痛覚過敏反応の分子基盤になる可能性も明らかになった。最近、眼窩下神経切断による内側毛帯線維の新規動員は、眼窩下神経の支配領域以外の部位から誘導されていることが明らかになった (Takeuchi et al., eNeuro. 4, 2017)。現在までに、tonic GABA_A 受容体電流が増加する直接的な原因の解明には至っていないが、こうした視床領域におけるシナプスレベルでの可塑性が、神経切断による求心路遮断により低下した末梢からの体性感覚情報入力を補正するために、眼窩下神経の支配領域外から新たに求心性線維を動員して神経回路の再改編を誘導し、一方で異所性痛覚過敏反応を形成させる分子基盤の一端を担っていると推察している。本研究の成果は、学術論文として国際雑誌に投稿中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 南雲康行、竹内雄一、宮田麻理子
Remodeling of somatosensory thalamic neural circuit and allodynia-like mechanical hypersensitivity after the peripheral nerve injury are attributed to potentiated tonic GABA currents onto somatosensory thalamic neurons
第 38 回日本神経科学大会 Neuroscience2015、神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)、2015. 7. 28-31.

[図書]
なし

[産業財産権]

なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南雲 康行 (NAGUMO, Yasuyuki)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教
研究者番号: 00459661

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし