

令和元年6月6日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18995

研究課題名(和文)末梢神経の損傷に伴う中枢神経回路の改編におけるミクログリア活性制御とその機能

研究課題名(英文)The role of microglia in aberrant synaptic remodeling induced by peripheral nerve injury

研究代表者

植田 禎史(Ueta, Yoshifumi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00511015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢の感覚神経が損傷を受けると、直接的には障害されない脳神経回路が改編される。この感覚神経を伝導する回路の改編は、体性感覚機能の異常を引き起こす。しかし、どのようなメカニズムが、末梢神経の損傷に伴う神経回路改編を引き起こすかについてはよくわかっていない。本研究では、マウスのヒゲ感覚神経を切断する神経損傷モデルマウスを用いて、体性感覚経路の、特に脳幹から視床への入力経路のシナプス改編に着目した。神経切断は脳幹において顕著なミクログリアの活性化を引き起こす。このミクログリアを薬理的に除去することで、神経損傷に伴う視床シナプスの改編を抑制することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経の損傷は神経障害性疼痛や感覚機能の異常を引き起こし、これらに対する根本的治療法はいまだ確立されていない。これまでの多くの研究で、脳の感覚神経伝導路が可塑的な改編を受けることが、機能的な異常に重要な役割を果たすと考えられてきた。本研究は動物モデルを用いて詳細な回路機能を調べ、神経損傷に伴う体性感覚経路の改編を抑制する手段を見出した。この成果をさらに進展させることで、将来的には神経損傷に伴う機能異常を抑制する治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve injury rapidly reorganizes somatotopic maps in the adult brain. In mice, whisker deafferentation induces synaptic remodeling of ascending fibers on neurons in the barreloids of the ventral posteromedial (VPM) nucleus. VPM neurons receive multiple fibers derived not only from whisker but also from non-whisker regions of the brainstem, resulting in reorganized whisker map. However, it is unclear what mechanisms regulate this aberrant plasticity. Here I examine the involvement of microglia which are associated with formation and refinement of synapses. Microglial activity was increased in the whisker sensory pathway after the nerve injury. I found that the depletion of microglia suppressed nerve injury-induced synaptic remodeling in VPM.

研究分野：神経科学

キーワード：体性感覚 脳幹 視床 ミクログリア シナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の損傷は、損傷部位から遠く離れた中枢神経系で神経回路の再構築を引き起こす。坐骨神経や三叉神経を経て脳へ入力された体性感覚は、それらの中継する神経核・皮質領野の特定のニューロン群によって、特定の体部位への感覚情報が伝搬される(体性局在地図)。末梢神経の損傷は、損傷部位の感覚を中継する領域(受容野)の縮小と、損傷部位周辺の受容野の拡大を引き起こす。これまでの多くの研究から、こうした回路レベルでの可塑的再構築が、神経損傷に伴う神経障害性疼痛や感覚機能異常を引き起こすのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、神経損傷に伴う中枢神経回路の再構築を誘導・制御するメカニズムを明らかにすることを目的として本研究を進めた。神経損傷は脳内の免疫応答を賦活化することが知られている。そこで、神経回路の再構築を誘導するメカニズムとして、ミクログリア(脳内の免疫応答を仲介するグリア細胞)の役割に着目した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物としてマウスを、体性感覚伝導路としてヒゲ感覚経路を対象に実験を行った。マウスのヒゲ感覚は三叉神経の第二枝である眼窩下神経によって支配される。ヒゲ感覚は眼窩下神経および神経節細胞を経て脳へと情報を伝導する。脳においてヒゲ感覚は脳幹、視床、大脳皮質と伝導される。本研究では特に脳幹から視床への入力回路に焦点を当てた。

(2) 麻酔下で眼窩下神経を末梢側および中枢側の二カ所で切断し、約1~2 mmの神経を取り除くことで、神経損傷モデルマウスを作製した。この神経切断から約一週間で、体性感覚経路の脳幹から視床へ入力するシナプスのリモデリングが引き起こされる(Takeuchi 他、2014、2017)。視床シナプスのリモデリングは電気生理学的な手法と組織学的な手法の両方によって確認した。

(3) 脳内におけるミクログリアの分布・活性化を調べるため、抗 Iba1 抗体を用いて固定脳切片の免疫組織化学染色を行った。

(4) 電気生理実験として、マウスの矢状断脳切片を作製し、視床 VPM 核ニューロンから電位固定条件にてホールセルパッチクランプ記録を行った。興奮性のシナプス応答を記録するため、脳幹に由来する投射軸索が走行する内側毛帯線維を電気刺激した。

(5) VPM 核において、脳幹ニューロンに由来する投射軸索終末は型の小胞性グルタミン酸輸送体を発現する。脳幹から視床への経路は体性局在地図を保存しており、脳幹のヒゲ受容野ニューロンは VPM 核のヒゲ受容野ニューロンへ投射する。神経切断を行うと、VPM 核ヒゲ受容野へ、脳幹のヒゲ以外の受容野に由来する異所的な軸索が侵入するようになる。そこで、体性感覚を司る脳幹領域において、ヒゲ受容野のニューロン選択的に Cre が発現する遺伝子改変マウスを用いて、これとレポーターマウスを交配させることで、VPM 核内における脳幹ヒゲ受容野に由来する軸索終末のみを蛍光タンパク質で標識した。

(6) マウスの感覚刺激に対する応答性を行動学的に評価した。マウスの下顎に von Frey フィラメントを当てる。フィラメントの加重が徐々に大きくなるにつれ、ある一定の加重がかかった時点でマウスは逃避行動を示すようになる。その時点の加重を逃避行動の閾値と設定した。

4. 研究成果

(1) 神経切断は脳幹ヒゲ受容野領域において顕著なミクログリアの活性化を引き起こした。脳幹の三叉神経主知覚核の腹側部にはヒゲの受容野が存在する。片側のヒゲ感覚神経を切断したマウスでは、神経切断後直ちに脳幹ヒゲ受容野におけるミクログリアの密度が上昇する。ミクログリアの密度は切断翌日には偽手術群(皮膚は切開し、神経を一旦露出するが、神経自体は無傷のままにする)に比べて統計的に有意に上昇し、視床シナプスの改編が引き起こされる一週間後まで高いまま維持された。一方、シナプス改編の舞台である視床 VPM 核におけるミクログリアの密度は、神経切断によって大きな影響を受けなかった。脳幹では、神経切断によってミクログリアの密度が上昇するだけでなく、ミクログリアにおける貪食性小胞マーカータンパク質の発現が上昇していたことから、非常に活性化された状態にあることもわかった。

(2) 脳内におけるミクログリアの活性化を抑制するために、ミクログリアの除去を試みた。ミクログリアの増殖に必須であるシグナル経路を阻害する薬剤を餌に混ぜ、マウスに1週間与えることで脳内のほぼ全て(~95%近く)のミクログリアを除去することが可能である(Elmore 他、2014)。同様の方法を導入することで、効率的にミクログリアを除去することができた。

(3) ミクログリアを除去したマウスに神経切断を行うと、神経切断に伴って引き起こされる視床シナプスの改編(VPM 核ニューロンが異常に多くの脳幹由来軸索線維から入力を受けるよ

うになり、その中には異所的な入力が多く含まれる)が抑制された。

(4) ヒゲ感覚神経の切断は、マウスにおいてヒゲ感覚が支配する領域に近接した部位(例えば下顎領域)への感覚刺激に対する過敏な応答を引き起こす。この過敏応答は、ミクログリアを除去してから神経切断を行ったマウスにおいては見られなかった。

<引用文献>

Yuichi Takeuchi, Miwako Yamasaki, Yasuyuki Nagumo, Keiji Imoto, Masahiko Watanabe, Mariko Miyata, Rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice caused by peripheral sensory nerve transection, *The Journal of Neuroscience*, 32 巻, 2012, 6917-6930

Monica RP Elmore, Allison R Najafi, Maya A Koike, Nabil N Dagher, Elizabeth E Spangenberg, Rachel A Rice, Masashi Kitazawa, Bernice Matusow, Hoa Nguyen, Brian L West, Kim N Green, Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain, *Neuron*, 82 巻, 2014, 380-397

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 巻, 2017, doi: 10.1523/ENEURO.0345-16.2017

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Wataru Kamei, Hajime Matsumine, Hironobu Osaki, Yoshifumi Ueta, Satoru Tsunoda, Mari Shimizu, Kazuki Hashimoto, Yosuke Niimi, Mariko Miyata, Hiroki Sakurai, Axonal supercharged interpositional jump-graft using a hybrid artificial nerve conduit with adipose-derived stem cells in facial nerve paresis rat model, *Microsurgery*, 38 巻, 2018, 889-898

Mari Shimizu, Hajime Matsumine, Hironobu Osaki, Yoshifumi Ueta, Satoshi Tsunoda, Wataru Kamei, Kazuki Hashimoto, Yosuke Niimi, Yorikatsu Watanabe, Mariko Miyata, Hiroyuki Sakurai, Rat facial nerve regeneration using hybrid PGA-collagen nerve conduits filled with adipose-derived stem cells and stromal-vascular-fractions, *Wound Repair and Regeneration*, 26 巻, 2018, 446-455

植田 禎史, 神経損傷に伴う体部位再現図の再構築, *Precision Medicine*, 査読無, 1 巻, 2018, 259-299

植田 禎史, 中枢神経回路の可塑的再構築, *アグリバイオ*, 査読無, 2 巻, 2018, 1118-1121

植田 禎史, 神経損傷に伴う中枢回路の再構築, *細胞*, 査読無, 50 巻, 2018, 323-326

[学会発表](計8件)

Yoshifumi Ueta, Mariko Miyata, Regulation of aberrant synaptic remodeling in the thalamus triggered by peripheral nerve injury, *The 9th FAOPS Congress*, 2019

Yoshifumi Ueta, Mariko Miyata, Suppression of microglia prevents nerve injury-induced synapse remodeling in the thalamus, *Cold Spring Harbor Asia "Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits"*, 2018

Yoshifumi Ueta, Sachie Sekino, Yuichi Takeuchi, Yoko Katayama, Mariko Miyata, Suppression of microglia prevents nerve injury-induced remodeling of thalamic circuits and ectopic allodynia, *第41回日本神経科学大会*, 2018

Yoshifumi Ueta, Yasuo Kawaguchi, Ipsilateral and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2/3 of rat frontal cortex, *第95回日本生理学会*, 2018

Yoshifumi Ueta, Sachie Sekino, Futaba Miyoshi, Yuki Yagasaki, Yoko Katayama, Mariko Miyata, Developmental and nerve-injury induced regulation of microglia function in mouse somatosensory circuits, *The 48th NIPS International Symposium "Neural circuitry and plasticity underlying brain function"*, 2017

Yoshifumi Ueta, Yasuo Kawaguchi, Corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2/3 of rat frontal cortex, *第95回日本生理学会*, 2018

Yoshifumi Ueta, Yuki Yagasaki, Yoko Katayama, Hironobu Osaki, Mariko Miyata, Developmental and injury-induced regulation of microglial function in the whisker-related somatosensory pathway, *第40回日本神経科学大会*, 2017

植田 禎史, 大脳皮質投射ニューロンの多様性, *新学術領域「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」第3回若手の会*, 2016

[その他]

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/neurophysiology/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。