

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800063

研究課題名（和文）：末梢感覚神経切断による視床内求心性線維再投射現象の電気生理学および解剖学的解析

研究課題名（英文）：Electrophysiological and neuroanatomical analyses of peripheral nerve transection-induced multiple-innervation of lemniscal fibers in the somatosensory thalamus of mice

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

マウス体性感覚視床中継細胞は末梢感覚神経切断後に複数の求心性線維に支配されるようになるが、新規投射線維の起源や配線様式は不明であった。本研究により、切断後、個々の求心性線維に異所性側枝が生じて側方の中継細胞に投射することが電気生理学および解剖学的に証明された。本研究により見出された求心性線維側枝による配線変化は、感覚入力遮断後の視床で観察される受容野拡大や幻肢覚等の病態に寄与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Relay neurons in the somatosensory thalamus of mice receive unusual multiple lemniscal fiber innervations after peripheral nerve transection; however the origin and wiring of the new lemniscal fibers were unknown. In this study, I found electrophysiological and anatomical evidence for ectopic collaterals of lemniscal fibers innervating neighbor relay neurons after the injury. The rewiring found in this study may be a neural basis for changes in receptive fields in the thalamus or phantom sensations after deafferentations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2011年度	770,000	231,000	1,001,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,950,000	585,000	2,535,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経損傷、視床、シナプス

1. 研究開始当初の背景

マウス体性感覚視床中継細胞は幼若期には多数の内側毛帯線維（求心性線維）入力を受けるが、その後余剰な内側毛帯線維は活動依存的に除去され、生後 21 日（P21）までに一本の強力な内側毛帯線維に支配されるようになる。我々は一度一本支配が成立した後に、末梢感覚神経である眼窩下神経（三叉神経第二枝）を全切断することで、わずか一週間以内に対応する体性感覚視床内中継細胞が再び複数の内側毛帯線維様入力を受けるようになることを電気生理学的に見出していた。しかしながら新規投射線維の起源および配線様式等、解剖学的な情報および空間的な機能解析が不足していた。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究課題では、眼窩下神経切断後において（1）順行性神経トレーサーを用いて内側毛帯線維を可視化し、末梢感覚神経切断による形態変化を捉えること、および（2）単一内側毛帯線維の視床内配線様式を多数の中継細胞からシナプス応答を記録することで内側毛帯線維再配線現象を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）眼窩下神経切断モデル：C57BL/6 マウスの左側眼窩下神経を麻酔下で全切断した。
 （2）内側毛帯線維の可視化：ラットで用いられている方法を、マウス用に改変して確立した (Veinante and Deschênes, J. Neurosci. 19, 5085-5095, 1999)。P24 のマウスを麻酔し、脳定位装置に固定した。順行性神経トレーサーである 2% BDA-10k PBS 溶液を先端抵抗 1-7MΩ 程度のガラス電極に充填し、神経発火を記録しながら電極の先端を三叉神経主知覚核に進めた (図 1)。その後、BDA-10k を電気泳動的に注入した (+1-5 μA, 3 s half duty cycle, 30 min)。動物を注入 4 日目に固定し、凍結連続切片を作成し、BDA-10k 標識内側毛帯線維を ABC-DAB 法で可視化した。可視化した内側毛帯線維を NeuroLucida システムにより 3 次元再構築して解析した。

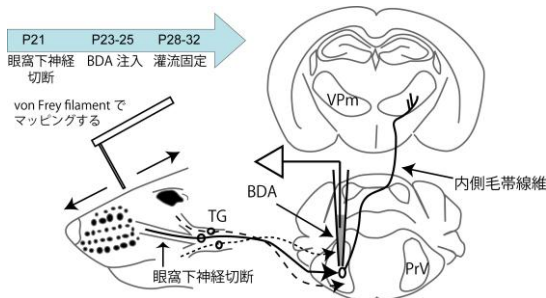


図 1、BDA-10k による内側毛帯線維の標識。

（3）視床内内側毛帯線維配線の機能的解析：P28-32 のマウスから右側体性感覚視床を含む 300 μm 厚矢状断脳切片を作成した。半径 100 μm 以内に分布する 3 個の中継細胞から同時に全細胞パッチクランプ記録を行い、単一内側毛帯線維を微小電気刺激して、興奮性シナプス後電流（内側毛帯 EPSCs）を記録した (図 2)。

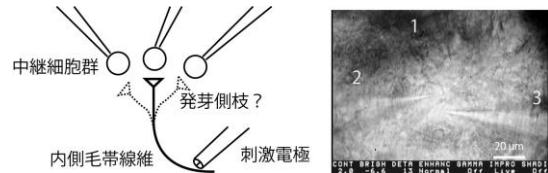


図 2、電気生理記録模式図および実際の記録。

4. 研究成果

（1）上記の方法により、個々の内側毛帯線維終末形態を可視化することに成功した (図 3、4、および 5)。末梢神経を切断しない偽手術群 (sham 群) において、個々の内側毛帯線維はあまり分岐をせず視床内を進み、終末付近で多数分岐し、直径 100 μm 程度の範囲に限局して多数のシナプスブトン (boutons) を形成した。限局したシナプスブトンの中心座標から 50 μm 以上離れた位置で生じた分岐を異所性分枝節 (ectopic node) と定義して、解析したところ、全分岐数中 $9.6 \pm 2.7\%$ (mean \pm S.E.M., $n=21$ fibers) であり、比較的稀であった。一方、末梢神経切断群 (IONC 群) の内側毛帯線維は、分岐数、終末数、およびシナプスブトン数が偽手術群に比して顕著に減少していた。分岐数の減少は主に偽手術群様のシナプスブトンが集合した領域付近での減少に因り、逆にその領域以外においての異所性分枝節は増加し、軸索の発芽側枝が生じたことを示唆している。異所性発芽側枝の増加により、個々の内側毛帯線維が終末する空間的分布は拡大し、その結果、単一軸索軸索に関して終末間、シナプスブトン間の距離が延長した。個々の内側毛帯線維終末領域の拡大が多数の内側毛帯線維終末領域の重なりを生じ、その重なりが電気生理学的に見出された再多重化現象の基盤である可能性がある。

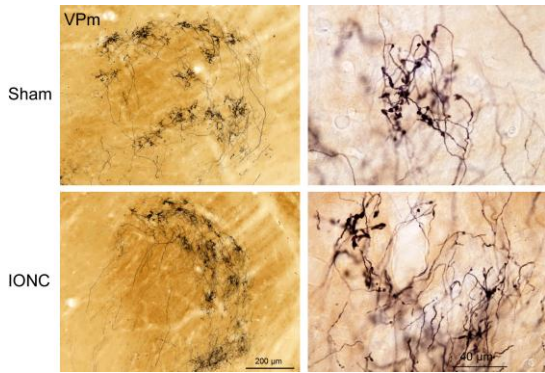


図3、BDA-10kにより標識された視床VPm核内における内側毛帯線維終末像。

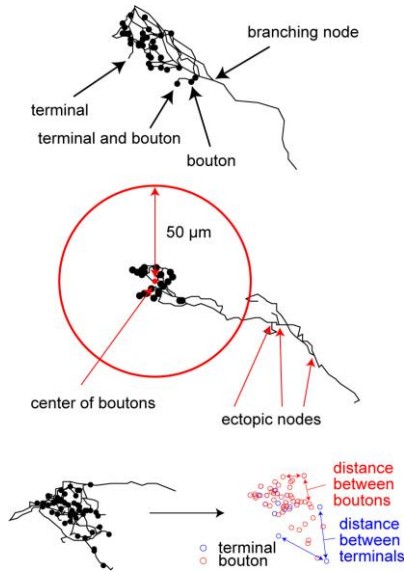


図4、Neurolucidaによる単一内側毛帯線維終末形態の解析。

(2) 末梢神経切断により生じた内側毛帯線維発芽側枝が機能的なシナプスを形成しているか、電気生理学的な検討を行った。3つの視床中継細胞から同時に全細胞パッチクランプ記録を行い、内側毛帯線維を微小電気刺激し、単一内側毛帯線維の機能的終末配線を検討した。偽手術群においては、単一内側毛帯線維は3つの中継細胞のうち、常にただ1つの中継細胞に強力なEPSCを生じ(-70 mV保持時に振幅として500 pA以上)、2つ以上の中継細胞に同時に入力することは無かった(n = 6 fibers)。一方で、末梢神経切断群においては、単一の内側毛帯線維が2つの中継細胞に同時に入力する例が認められた(7例中1例)。その例において、片方の中継細胞には500 pAを越える強力なEPSCが入力する一方、他方の中継細胞には500 pA以下の非常に弱いEPSCが入力していた。この弱い内側毛帯入力、解剖学的に認められた異所性発芽側枝を介するEPSCである可能性があり、今後検討する必要がある。

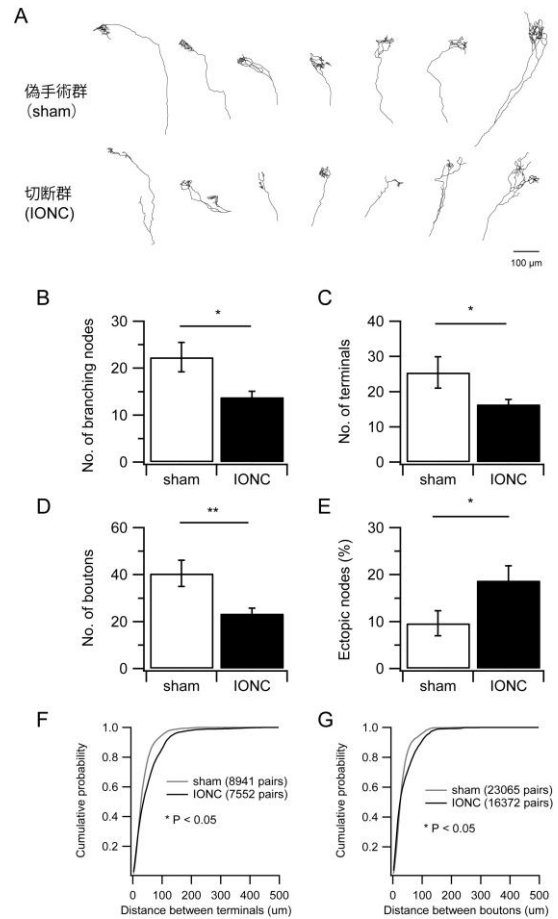


図5、Neurolucidaにより三次元再構築された内側毛帯線維終末像(A)およびその定量解析(B-G)。

本課題研究において、末梢感覚神経切断後における視床内求心性線維再配線現象が解剖学的および電気生理学的に詳細に検討することが出来た。三叉神経主知覚核を起源とする内側毛帯線維終末が末梢感覚神経切断後わずか一週間以内に大胆な形態変化を生じ、機能的な配線変化も生じていた。本課題研究の対象である内側毛帯線維再配線現象は、これまで末梢神経損傷後かなり長期間(年単位)を経ないと生じないと考えられていた軸索の大胆な再配線が、比較的早期に生じると示した点で興味深く、今後も解剖学的・生理学的な解析を進める必要がある。具体的には、形態学的に認められた異所性発芽側枝が実際にどのようなシナプス伝達を担い、どのように中継細胞を発火させるのか検討するために、内側毛帯線維をtdTomato等の蛍光タンパク質で標識し、内側毛帯線維の形態を認めながらその軸索を介するシナプス伝達、中継細胞応答をスライスパッチクランプ法で検討する。In vitroの系における機能的解析の効率化を進めるために機能的多細胞Ca²⁺イメージング法も導入したい。また内側毛帯線維の再配線が病態生理的にどのような意味を持つのか検討するために、in

vivo で視床内の受容野がどのように変化していくのか、その変化が再配線現象と経時的にどの程度関連しているのか、検討していく。

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2件)

① Takeuchi Y., Yamasaki M., Nagumo Y., Imoto K., Watanabe M., and Miyata M. Rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice caused by peripheral sensory nerve transection. The Journal of Neuroscience, in press, 2012, 査読有

② 宮田麻理子、竹内雄一、身体地図のリモデリング、Clinical Neuroscience 誌、29巻、895-899、2012、査読無

[学会発表] (計3件)

① Miyata M. *et al.*, Peripheral sensory nerve transection-induced remodeling of afferent synapses in the somatosensory thalamus of mice., 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011/7/18, Florence, Italy.

② Takeuchi Y. *et al.*, Transection of the infraorbital nerve induces rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice. 第40回北米神経科学学会年会、2010/11/15、San Diego, U.S.A.

③ 竹内雄一ら、末梢感覚神経切断は体性感覚視床における求心性シナプスの再編成を誘導する、第33回日本神経科学大会、2010/9/4、神戸

[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

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