

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790580

研究課題名(和文) 神経損傷後の視床神経回路改編と視床細胞活動の関係性 ウイルスベクターによる解析

研究課題名(英文) Analysis of GABA synaptic modulation on neuronal activity and the remodeling of medial lemniscal fibers after the peripheral nerve injury in the somatosensory thalamus: using lentivirus vector method

研究代表者

南雲 康行 (Nagumo, Yasuyuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00459661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経回路は、末梢感覚神経の損傷により再改編されるが、神経損傷による抑制性シナプス入力の変化が、この機構に積極的に関与するか否かは未だ不明である。本研究では、眼窩下神経切断モデルマウスを用い、求心性内側毛帯線維の再改編が生じる視床細胞において選択的に tonic GABA 電流が増加し、この増加が、視床細胞の発火頻度抑制や神経切断による内側毛帯線維再改編誘導の一因になることを明らかにした。以上より、眼窩下神経切断時における tonic GABA 電流の増加は、視床細胞の活動性低下と内側毛帯線維の新規動員による再多重化を誘導させ、末梢からの体性感覚情報入力を補正している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that cut of the infraorbital nerve (IONC) recruits additional excitatory medial lemniscal fibers onto somatosensory thalamic neurons (VPM neurons) within a week. On the other hand, it is also reported that peripheral nerve injury induces remodeling in the central nervous system through functional changes of inhibitory GABA system. However, it remains unclear whether the remodeling of lemniscal fibers onto a VPM neuron after the IONC is mediated by postoperative changes in inhibitory GABA currents. Here we report that the IONC markedly enhanced the amplitude of tonic GABA currents onto a VPM neuron that had multiple lemniscal fibers by the IONC. Moreover, we found that lack of tonic GABA currents by lentivirus vector prevented the remodeling of lemniscal fibers onto a VPM neuron after the IONC. These results indicate that the remodeling of lemniscal fibers onto a VPM neuron after the IONC is mediated by enhanced tonic GABA inhibition by the IONC.

研究分野：神経生理

キーワード：脳・神経 神経科学 体性感覚視床 神経損傷 GABA 内側毛帯線維 神経回路再改編

1. 研究開始当初の背景

四肢の切断や脊髄損傷による求心路遮断は、体性感覚視床 (VPM 核) で受容野の再構成を誘導する大規模な神経回路の再改編を引き起こす。この様な神経回路の再改編は、難治性疼痛である幻肢痛のメカニズムにも類似した点が多く、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、現段階では、解剖学あるいは *in vivo* による研究が多く、シナプスレベルの生理学的な研究は非常に少ないため、依然として再改編機構の詳細に不明な点が多い。

申請者らは、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 (P21) 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、発達期あるいは培養細胞中の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。申請者は、上述した回路改編モデルにおいて、眼窩下神経切断後 1-3 日目にして既に、VPM 細胞の抑制性 GABA シナプス入力 (視床網様核: RTN 由来) が減弱することを本申請段階で明らかにしていた。この減弱は、末梢神経損傷時の中枢神経系において、GABA 神経機能の減弱を示唆する解剖学的知見と一致する。また、同じ VPM 細胞での興奮性内側毛帯シナプスでは、神経切断によっても全体の入力電流量がほとんど変化しない。これらの結果は、VPM 細胞活動の変化が、神経切断による抑制性および興奮性シナプス双方からの入力バランス変化によって生じている可能性を示唆するものであり、特に抑制性 GABA シナプス入力の変化が、興奮性内側毛帯線維の再改編機構に関与している可能性を示唆する。こうした背景から、申請者は、眼窩下神経切断時における VPM 細胞での GABA シナプス入力変化に着目し、VPM 細胞活動と内側毛帯線維の再改編への影響について研究を開始した。

2. 研究の目的

眼窩下神経切断による VPM 細胞での抑制性 GABA シナプス入力の変化に着目し、神経切断後翌日から内側毛帯線維改編時期に至るまでの継時的変化をシナプスレベル

で解析した。さらに、この GABA シナプスでの変化が、VPM 細胞の活動性変化や内側毛帯線維の再改編現象の要因になるか否かについて、ウイルスベクター遺伝子導入法を用いて検討した。

3. 研究の方法

内側毛帯線維が一本化に成熟する P21 で、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。眼窩下神経切断時における VPM 細胞活動は、ステンレス形記録電極を用いた *in vivo* unit recording 法により解析した。神経切断下における内側毛帯線維再改編に対する GABA シナプス入力変化の影響については、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、VPM 核へ慢性持続処置した際の内側毛帯線維の改編動態を電気生理学的に検討した。また、眼窩下神経切断前における lentivirus ベクターによってシナプス外 GABA_A 受容体電流 (tonic GABA 電流) を欠損させることにより、神経切断による VPM 細胞での内側毛帯線維再改編への影響についても同様に電気生理学的に検討した。

4. 研究成果

抑制性 GABA シナプスでは、シナプス部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 電流) とシナプス外部電流 (tonic GABA 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。視床網様核の電気刺激による phasic GABA 電流の振幅は、眼窩下神経切断後 1-3 日目の VPM 細胞において著明に減少し、この減少は術後 7 日目においても同様に認められた。しかしながら一方で、tonic GABA 電流の振幅は、術後 1-3 日目において著明に増加し、この増加は術後 7-9 日目においても認められた。興味深いことに、この tonic GABA 電流の増加は、求心性内側毛帯線維の再改編を受ける VPM 細胞でのみ選択的に認められた。そこで、神経切断時における VPM 細胞での抑制性・興奮性シナプス入力バランスを検討するため、VPM 細胞における自発性抑制性および興奮性シナプス後電流 (sIPSC および sEPSC) と tonic GABA 電流から入力電荷量を計算し、入力電荷比 (inhibitory/excitatory ratio) を算出した。その結果、神経切断後に内側毛帯線維の再改編を受けた VPM 細胞では、対照群と比較して inhibitory/excitatory ratio が有意に増加していた。これらの結果は、眼窩下神経切断下の VPM 細胞では、抑制性シナプス部の phasic GABA 電流量減少とシナプス外部の tonic GABA 電流量増加が興奮性内側毛帯線維の再改編に先

立って、切断後早期から変化することを示す。さらに、電荷比計算から、神経切断時に内側毛帯線維の再改編を受ける VPM 細胞では、tonic GABA 電流量増加に起因した強い抑制性入力を受けている可能性が示唆される。神経細胞における tonic GABA 電流は、神経細胞の活動性や発火パターン形成に関与しており、tonic GABA 電流そのものの増加は、細胞活動の低下や tonic 発火から burst 発火への発火パターン転換に寄与する。そこで次に、眼窩下神経切断時の VPM 細胞活動を *in vivo* unit recording により解析したところ、神経切断時では VPM 細胞の発火頻度が有意に低下していることが明らかになった。さらに、burst 発火の発生確率が有意に上昇していることも明らかになった。臨床における幻肢痛患者では、異常 burst 発火の増加が明らかにされているため、感覚入力遮断による細胞活動性や活動パターンの変化には、tonic GABA 電流の増加が一因となっている可能性が示唆される。

一方、前述した様に、tonic GABA 電流の増加は、神経切断による内側毛帯線維の再改編時期よりも早期に生じ、この増加が内側毛帯線維の再改編を受けた VPM 細胞でのみ選択的に認められている。この結果は、眼窩下神経切断による tonic GABA 電流の増加が、内側毛帯線維再改編の引き金になっている可能性を示唆する。そこで次に、皮下埋め込み式の浸透圧ポンプを用い、シナプス外 GABA_A 受容体作動薬 (THIP) を 1 週間持続的に正常マウスの VPM 核へ処置することにより、tonic GABA 電流増加による内側毛帯線維の改編動態について電気生理学的に検討した。その結果、対照群 (saline 処置群) と比較して、シナプス外 GABA_A 受容体作動薬持続処置群では、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が認められた。また、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するため、 $\alpha 4$ サブユニットに 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 電流欠損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 ベクターにより tonic GABA 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 電流の増加に起因して誘導されることを示唆する。前述するように、ポストシナプス細胞の P/Q 型 Ca²⁺ チャネルの欠損などによる細胞活動低下時においては、シナプス除去過程の障害などが誘導される。すなわち、眼窩下神経切断による tonic GABA 電流の増加は、VPM 細胞の活動性低下 (発火頻度低下) と内側毛帯線維の新

規動員に伴う再多重化を誘導させ、末梢からの体性感覚情報入力を補正している可能性が考えられる。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 1 件)

1. Yuichi Takeuchi, Miwako Yanazaki*, 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*, 32:6917-6930 (2012). (査読有) *: Equally contributed

[学会発表] (計 4 件)

1. 南雲康行、竹内雄一、尾崎弘展、宮田麻理子
Enhanced tonic GABA currents after peripheral nerve injury contribute to inhibition of neuronal activity and subsequent remodeling of medial lemniscal fibers in the somatosensory thalamus.
第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)、2015.3.21-23.
2. 南雲康行、宮田麻理子
Role of extrasynaptic GABA_A receptor on the remodeling of medial lemniscal fibers in the somatosensory thalamus by peripheral nerve injury.
第 37 回 日本神経科学大会 Neuroscience 2014、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、2014.9.11-13.
3. 南雲康行、宮田麻理子
Phasic-GABA current in thalamic relay neurons is reduced by peripheral nerve injury, whereas tonic-GABA current is increased.
第 36 回 日本神経科学大会 Neuro 2013、国立京都国際会館 (京都府・京都市)、2013.6.20-23.
4. 南雲康行、宮田麻理子
Contrary changes of phasic- and tonic-inhibition onto thalamic relay neurons in mice with infraorbital nerve cut.
第 90 回日本生理学会大会、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)、2013.3.27-29.

[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)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00459661