

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870757

研究課題名(和文) 中枢性疼痛に関わる求心路再編の可視化とその発達・維持の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying development and maintenance of thalamic remodeling after peripheral nerve injury

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：末梢感覚神経切断により上行性感覚経路が遮断されると、しばしば幻肢痛等中枢性疼痛が生じる。そのような中枢性疼痛の神経基盤として求心路再編による求心性情報の混線が示唆されてきたが、その解剖学的実態および分子機構は不明であった。本研究では、マウスヒゲ感覚神経切断後に生じるヒゲ感覚視床内求心性線維の再配線現象に着目し、経路特異的求心路可視化法、視床神経細胞受容野解析、感覚試験、および視床特異的遺伝子欠損マウスを用いて、求心路再編の解剖学的実態、疼痛との関連、および求心路再編の必要条件としてのグルタミン酸受容体の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Peripheral sensory nerve injury causes reorganization of neural circuitry in the central nervous system as well as abnormal ectopic sensation occasionally resulting in pain. However, although contamination of afferent sensory information has been suggested, concrete neural bases and molecular mechanisms of the pain still remain unknown. In the present study, we focused on remodeling of afferent fibers in the whisker sensory thalamus after peripheral sensory nerve injury and its relationship with abnormal ectopic sensation and molecular bases. We found that new afferent innervations from non-whisker brain stem nuclei to the whisker sensory thalamus after transection of the whisker sensory nerve disrupted somatotopic organization in the thalamus. The large-scale anatomical reorganization spatially and temporally correlated with abnormal ectopic sensations after the injury. Furthermore, thalamus-specific knockout of a specific glutamate receptor inhibited the afferent fiber remodeling.

研究分野：神経生理学・神経科学一般、疼痛学

キーワード：神経損傷 体性感覚 視床 神経回路 軸索 可視化 受容体 in vivo

### 1. 研究開始当初の背景

末梢感覚神経切断や脊髄損傷により上行性感覚経路が遮断されると、しばしば幻肢痛等中枢性疼痛が生じる<sup>1,2</sup>。そのような中枢性疼痛の基盤として視床回路再編に伴う求心性情報の混線および体性局在変化が、サルの視床神経細胞受容野記録<sup>3</sup>やヒトの手術中記録<sup>4</sup>から示唆されていたが、その神経解剖学的実態や分子機構は不明であった。我々はこれまでに、マウスのヒゲ感覚神経(三叉神経第二枝)切断により、視床神経細胞が多数の新規求心性線維投射を受けようになること(内側毛帯線維再編)、また再編視床回路には、通常存在しないグルタミン酸受容体サブタイプ(GluA2 受容体)が出現することを明らかにしてきた<sup>5</sup>。さらにヒゲ感覚神経切断後に、近隣下顎領域(三叉神経第三枝領域)に疼痛等感覚異常が生じることも認めていた。しかしながらヒゲ感覚神経切断後に生じる、視床回路再編、GluA2 受容体、感覚異常が相互に関連するのかわ不明であった。またこれらの変化と視床神経細胞の受容野変化との関連も不明であった。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究ではヒゲ感覚神経切断後に生じる視床回路再編、受容野再編、および感覚異常の相互関連を、その時間経過および体性局在情報に着目して明らかにすることを目的とした。さらに GluA2 受容体と視床回路再編との因果関係を明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) ヒゲ感覚神経切断モデル: C57BL/6 マウスのヒゲ感覚神経(三叉神経第二枝)を麻酔下で全切断した<sup>5</sup>。
- (2) 経路特異的内側毛帯線維可視化: ヒゲ感覚を司る脳幹核である腹側三叉神経主知覚核(PrV2)由来の内側毛帯線維特異的に蛍光タンパク質(tdTomato)を発現するマウスライン(Krox20-Ai14)<sup>6</sup>を用いた(図1)。
- (3) 内側毛帯線維起始核の逆行性標識: 逆行性トレーサーであるコレラトキシンBサブユニット(CTB)溶液を視床に注入し、その後標識された脳幹投射細胞の細胞体を免疫組織化学的に可視化した<sup>6</sup>。
- (4) 視床神経細胞の受容野記録: 麻酔下のマウス視床に金属微小電極を刺入し、全身の体性感覚刺激に対する反応をマルチユニット記録として記録した<sup>7</sup>。
- (5) 疼痛閾値の記録: マウスの三叉神経第二枝領域および第三枝領域に、様々な強さの von Frey フィラメントを適応して、50%逃避閾値を求めた<sup>8</sup>。
- (6) 視床特異的 GluA2 受容体欠損マウスの作成および内側毛帯 EPSC 記録による視床回路再編の解析: 視床神経細胞特異的に Cre DNA リコンビナーゼを発現するマウスライン(SERT-Cre)<sup>9</sup>と Cre 依存的に GluA2 受容体を

欠損する GluA2-flxed マウスラインとを交配し、視床特異的 GluA2 受容体欠損(GluA2-cKO)マウスを作成した。GluA2-cKO マウスの視床スライスを作成し、視床細胞からパッチクランプ記録を行い、内側毛帯 EPSC のステップ数を計数することで、記録視床細胞に入力する内側毛帯線維数を計数した<sup>5</sup>。

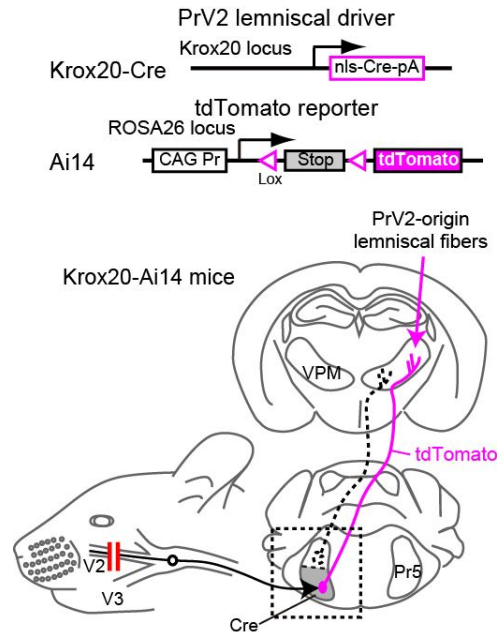


図1: Krox20-Ai14 マウス

### 4. 研究成果

#### (1) 内側毛帯線維再編の解析

##### 経路特異的内側毛帯線維可視化

Krox20-Ai14 マウスを用いて、ヒゲ感覚内側毛帯線維を特異的に可視化した。当該マウスのヒゲ感覚視床切片を、内側毛帯線維終末のマーカである小胞性グルタミン酸トランスporter-2 型(VGluT2)に対する抗体を用いて蛍光組織化学染色したところ、tdTomato 陽性および tdTomato 陰性内側毛帯線維終末を認めた(図2)。tdTomato 陽性および tdTomato 陰性内側毛帯線維終末は、それぞれ腹側三叉神経主知覚由来およびそれ以外の脳幹核由来の内側毛帯線維終末であり、すなわちそれぞれヒゲ感覚を司る終末およびヒゲ以外の感覚を司る終末であると考えられる。成獣マウスではヒゲ感覚視床において、約80%の内側毛帯線維終末が tdTomato 陽性である<sup>6</sup>。このヒゲ感覚視床回路に対するヒゲ感覚神経切断の影響を検討するため、視床回路の生後発達が完了した三週齢 Krox20-Ai14 マウスのヒゲ感覚神経を切断した。切断一週間後にヒゲ感覚視床の VGluT2 染色を行ったところ、tdTomato 陽性終末が減少し、一方で tdTomato 陰性終末が顕著に増加していた(図2)。これらの結果から、ヒゲ感覚神経の切断により、ヒゲ感覚視床からヒゲ感覚内側毛帯線維が退縮し、一方で非ヒゲ感覚内側毛帯線維がヒゲ感覚視床に侵入すると示唆された。さらにこの tdTomato 陽性終末数減少・tdTomato 陰性終末数増加の程

度は、パッチクランプ記録で検討した単一視床神経細胞に入力する内側毛帯線維数の増加<sup>5</sup>と相関していた。従って、今回明らかになった内側毛帯線維終末種の変化は、電気生理学的に報告されている視床回路再編の解剖学的実態であることが示唆された。

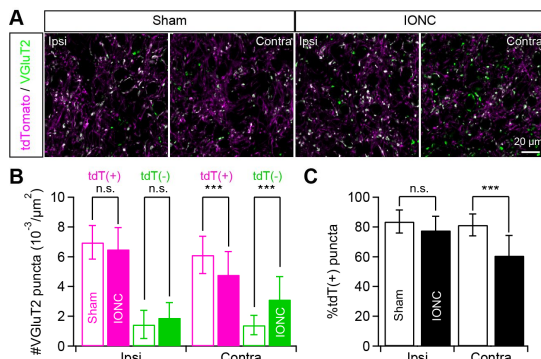


図2：内側毛帯線維再編  
(A) ヒゲ感覚視床の VGLUT2 免疫染色像。Sham: 偽手術群、IONC: ヒゲ感覚神経切断群。  
(B) 内側毛帯線維終末密度。(C) tdTomato 陽性終末の割合。Mean ± s.d. \*\*\**P* < 0.001; n.s., not significant.

#### 内側毛帯線維の起始核解析

ヒゲ感覚切断一週間後、ヒゲ感覚視床に逆行性トレーサーである CTB を注入し、内側毛帯線維（求心性線維）の起始核を検討した。その結果、コントロール群では主にヒゲ感覚を司る脳幹核群（PrV2、V2 Spl）が標識された。一方で、ヒゲ感覚神経切断群では、コントロール群で標識された核群に加えて、ヒゲ感覚を司らない脳幹核群（PrV3、V3 Spl、DCN）が顕著に標識された（図3）。PrV3、V3 Spl は下顎領域を司り、DCN は前後肢・体幹を司る。ヒゲ感覚切断群においては、これらの非ヒゲ脳幹核群からヒゲ感覚視床に求心性情報が入って送られ、視床における体性局在地図を再編していることが示唆された。さらにヒゲ感覚切断群においては温痛覚を司る SpC における標識が有意に増加していた。この温痛覚経路の増強が末梢神経切断後の疼痛発現に寄与している可能性がある。

#### (2) 視床神経細胞受容野再編の解析

ヒゲ感覚切断 1 - 2 週間後、麻酔下にヒゲ感覚視床に記録電極を刺入し、視床神経細胞の受容野をマップした。コントロール群においては、受容野は非常に少数のヒゲに限られていた（図4）。一方で切断群では、典型的にはヒゲやヒゲパッドの受容野が消失し、代わりに下顎領域から胸部に広がる広範な受容野が認められた。これらの通常認められない受容野は、ヒゲ感覚神経切断後に逆行性トレーサー実験で認められた非ヒゲ感覚脳幹核群の司る体部位と、一致していた。

#### (3) 疼痛の発現部位と時間経過の解析

ヒゲ感覚神経切断後に生じる疼痛の発現

部位とその時間経過を von Frey フィラメントを用いた逃避閾値の測定によって検討した。その結果、下顎領域において、切断後 6 日目から有意に逃避閾値が低下した（図5）。この疼痛発現の時間経過は、パッチクランプ記録で検討した単一視床神経細胞に入力する内側毛帯線維数の増加<sup>5</sup>と一致していた。さらに疼痛の時間経過を追跡したところ、少なくとも 3 ヶ月以上持続することが明らかになった。

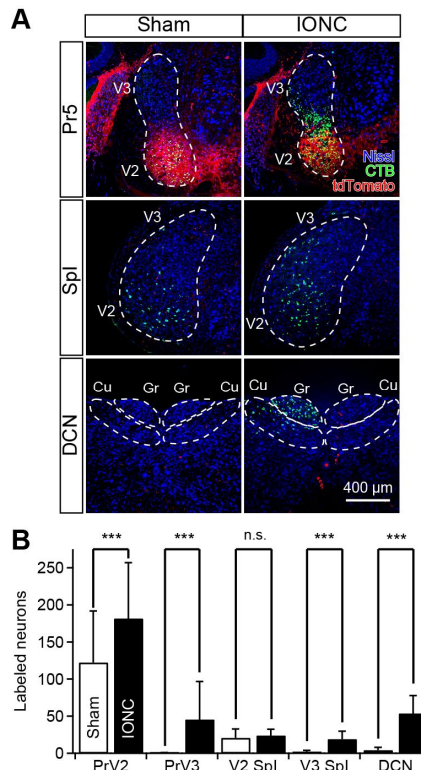


図3：内側毛帯線維の起始核  
(A) ヒゲ感覚視床より CTB で逆行性に標識された投射細胞群。(B) 標識細胞数の統計。Mean ± s.d. \*\*\**P* < 0.001; n.s., not significant.

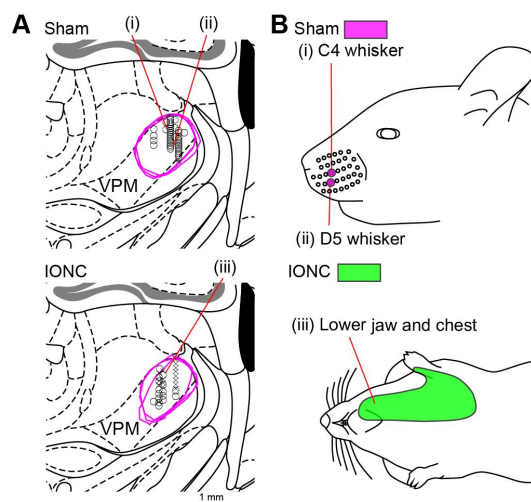


図4：ヒゲ感覚視床神経細胞の受容野  
(A) 記録部位。(B) 典型的受容野。

#### (4) 内側毛帯線維再編と視床神経細胞受容野再編の時間経過解析

(1)、(2)で検討した内側毛帯線維再編および視床神経細胞受容野再編を、それぞれ長期間追跡した。その結果、ともに疼痛と同様に、3ヶ月以上変化が持続していることが明らかになった。これら異なる方法で得た、観察結果の時間経過が一致していたことから、内側毛帯線維再編、視床神経細胞受容野再編、および疼痛発現とが相互に関連している可能性がある。

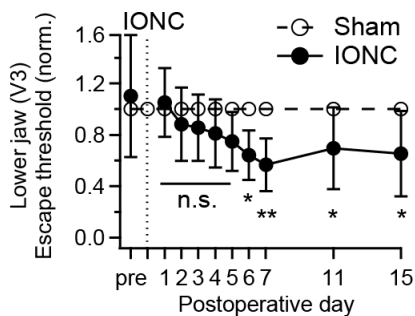


図5：下顎領域における von Frey 試験ヒゲ感覚神経切断後、下顎領域に対する機械刺激誘発逃避閾値は低下した。測定値は Sham 群に対して正規化済み。Mean  $\pm$  s.d. \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.01$ ; n.s., not significant.

#### (5) 内側毛帯線維再編への GluA2 受容体の関与解析

ヒゲ感覚神経切断後に再編内側毛帯線維のシナプス後部に特異的に発現する GluA2 受容体が、内側毛帯線維再編に関与しているか、視床特異的 GluA2 受容体欠損 (GluA2-ckO) マウスを作成して検討した。GluA2-ckO マウスの視床スライスを作成し、視床神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、既報に従って記録細胞に入力する内側毛帯線維数を計数した<sup>5</sup>。野生型群では、ヒゲ感覚神経切断後、内側毛帯線維数の増加が認められた。一方で、GluA2-ckO 群では、ヒゲ感覚神経切断後においても内側毛帯線維数が増加しない傾向が認められた。ただし現在のところ、記録細胞数が十分でないため、さらなる検討を行う必要がある。

本研究において、ヒゲ感覚神経切断後に生じるヒゲ感覚視床回路再編の解剖学的実態が、ヒゲ感覚内側毛帯線維の退縮と、非ヒゲ感覚内側毛帯の侵入であることが明らかになった。さらに内側毛帯線維再編、視床神経細胞受容野再編、および疼痛発現との相互関連が示唆された。また末梢神経切断後に視床で発現上昇する GluA2 受容体が、内側毛帯線維再編の必要条件である可能性が示唆された。これらの結果から、末梢神経切断後に視床における GluA2 受容体の機能を制御することで、視床回路の不適切な再編を抑制し、疼痛などの感覚異常発現を抑えられる可能性がある。この可能性を検討するため、GluA2-ckO マウスの解析をさらに推進する必要がある。

#### <引用文献>

Ramachandran V.S. and Hirstein W. (1998) The perception of phantom limbs. The D. O. Hebb lecture. *Brain* 121 (Pt 9), 1603-1630.

Flor H., Nikolajsen L., and Staehelin Jensen T. (2006) Phantom limb pain: a case of maladaptive CNS plasticity? *Nat Rev Neurosci* 7, 873-881.

Florence S.L., Hackett T.A., and Strata F. (2000) Thalamic and cortical contributions to neural plasticity after limb amputation. *J Neurophysiol* 83, 3154-3159.

Davis K.D. et al. (1998) Phantom sensations generated by thalamic microstimulation. *Nature* 391, 385-387.

Takeuchi Y. et al. (2012) Rewiring of afferent fibers in the somatosensory thalamus of mice caused by peripheral sensory nerve transection. *J Neurosci* 32, 6917-6930.

Takeuchi Y. et al. (2014) Large-scale somatotopic refinement via functional synapse elimination in the sensory thalamus of developing mice. *J Neurosci* 34, 1258-1270.

Miyata M. et al. (2003) Role of thalamic phospholipase C 4 mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain. *J Neurosci* 23, 8098-8108.

Seino H., Seo K., Maeda T., and Someya G. (2009) Behavioural and histological observations of sensory impairment caused by tight ligation of the trigeminal nerve in mice. *J Neurosci Methods* 181, 67-72.

Naroux-Neme N., Pavone L. M., Avallone L., Zhuang X., and Gaspar P. (2008) Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology* 55, 994-1005.

#### 5. 主な発表論文等

(〔雑誌論文〕(計6件))

Niimi Y., Matsumine H., Takeuchi Y., Sasaki R., Watanabe Y., Yamato M., Miyata M., and Sakurai H. (2015) Effectively axonal-supercharged interpositional-jump graft with an artificial nerve-conduit for rat facial nerve paralysis model. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 3:e416. 査読有 DOI: 10.1097/GOX.0000000000000397

Matsumine H., Sasaki R., Takeuchi Y., Watanabe Y., Niimi Y., Sakurai H., Miyata M., and Yamato M. (2014) Unilateral multiple facial-nerve branch

reconstruction using "end-to-side loop graft "supercharged by hypoglossal nerve. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2:e240. 査読有  
DOI: 10.1097/GOX.000000000000206

Sasaki R., Matsumine H., Watanabe Y., Takeuchi Y., Yamato M., Okano T., Miyata M., and Ando T. (2014) Electrophysiological and functional evaluations of regenerated facial-nerve defect with a tube containing dental pulp cells in rats. *Plast Reconstr Surg* 134:970-978. 査読有  
DOI: 10.1097/PRS.0000000000000602

Matsumine H., Takeuchi Y., Sasaki R., Kazama T., Kano K., Matsumoto T., Sakurai H., Miyata M., and Yamato M. (2014) Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 134:686-697. 査読有  
DOI: 10.1097/PRS.0000000000000537

Matsumine H., Sasaki R., Takeuchi Y., Miyata M., Yamato M., Okano T., and Sakurai H. (2014) 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. 査読有  
DOI: 10.1055/s-0033-1357500

Takeuchi Y., Asano H., Katayama Y., Muragaki Y., Imoto K., and Miyata M. (2014) Large-scale somatotopic refinement via functional synapse elimination in the thalamus of developing mice. *J Neurosci* 34:1258-1270. 査読有  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3865-13.2014

〔学会発表〕(計 13 件)

Takeuchi Y. et al. Large-scale somatotopic reorganization associated with afferent fiber rewiring in the whisker sensory thalamus. 第 38 回日本神経科学大会 (神戸コンベンションセンター・兵庫県中央区). 2015, July 30, 3P217.

Takeuchi Y. et al. Peripheral nerve injury changes neuronal firing patterns in the somatosensory thalamus of unanesthetized mice. 第 92 回日本生理学会大会 (パシフィコ横浜・神奈川県横浜市). 2015, Mar 23, P3-182.

Takeuchi Y. et al. Functional synapse elimination plays a role in large-scale

somatotopic refinement in the sensory thalamus of developing mice. Presented at the 44th SfN Annual Meeting; 2014 November 15-19, Washington, DC (USA) (Abstract #398.04)

Takeuchi Y. et al. Large-scale somatotopic reorganization via remodeling of thalamic afferent synapses after peripheral sensory nerve injury. 第 37 回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜・神奈川県横浜市). 2014, Sep11, S1-C-2-3.

Takeuchi Y. et al. A neural circuit mechanism of large-scale somatotopic reorganization in the thalamus after transection of the whisker sensory nerve of mice. 第 37 回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜・神奈川県横浜市). 2014, Sep12, P2-173.

Takeuchi Y. et al. Transection of the whisker sensory nerve reorganizes topographical wiring of afferent fibers in the whisker sensory thalamus of mice. 第 91 回日本生理学会大会 (鹿児島大学 郡山キャンパス・鹿児島県鹿児島市). 2014, Mar 16, 1P-104.

Takeuchi Y. and Miyata M. 生後発達期マウス視床におけるシナプス刈り込みは体性局在地図の先鋭化を担う。生理学若手研究者フォーラム「生体機能の解明」(順天堂大学・東京都文京区)。2013, Aug24, #1.

Takeuchi Y. and Miyata M. Somatotopic tuning along with synapse elimination in the whisker sensory thalamus of developing mice. 第 36 回日本神経科学大会 (国立京都国際会館・京都府京都市)。2013, June22, P3-1-143.

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://researchmap.jp/ytake/>

<http://orcid.org/0000-0001-7545-8401>

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