

『末梢神経切断による中枢神経回路再配線の解剖学的解析』 —幻肢痛神経基盤の抽出とその可視化—

1. 研究の目的

研究開始当初の背景

幻肢痛は四肢切断などにより失ったはずの体部位が痛むという難治性の病態である。我が国では毎年5000人以上の四肢切断患者が存在してその内80%以上が幻肢痛を発症するが、有効な治療法が存在しないため新たな治療法の開発が望まれている。治療法開発が進まない主な要因として、疾患の神経基盤が未知であることが挙げられる。すなわち従来幻肢痛患者においては、機能的脳画像法により視床や大脳皮質における体性局在再編成が示唆されてきたが [Flor H *et al* (1995) *Nature* 375: 482-484; Davis KD *et al* (1998) *Nature* 391: 385-387]、動物実験における幻肢痛の客観的評価が困難であったため、その神経基盤は未知のままであった。しかし近年、光遺伝学の進歩により遺伝学的に標識された特定神経回路の活動を操作することが可能になったため、動物実験による幻肢痛研究も現実的になりつつある [Tan KR *et al* (2012) *Neuron* 73: 1173-1183]。そこで私はマウスを用いてボトムアップに幻肢痛の神経基盤検討を行っている。その結果最近、マウスの髭の感覚神経（三叉神経第二枝）を切断すると、対応する視床の神経細胞が多数の新規内側毛帯線維（求心性線維）投射を受けるようになることを見いだした [Takeuchi Y *et al* (2012) *J Neurosci* 32: 6917-6930]。さらに感覚試験により、その再配線現象と同様の時間経過で下顎領域（三叉神経第三枝領域）に疼痛閾値の低下が生じることも認めた。そのため、“末梢神経切断により視床で回路新生が誘導され、新生回路の活動が疼痛を生じる”という仮説を設定した。この仮説に基づき、中長期研究計画として、まず①三叉神経第二枝切断による新生回路を遺伝的に抽出・可視化し、次に②抽出した新生回路を覚醒下で選択的に活性化することで痛みが生じるか検討し、さらに③新規疼痛回路の発達・維持に関わる分子を見いだすことを考えている。そうして視床における新生回路特異的な分子を標的にした、幻肢痛治療法開発の端緒としたいと考えた。

本研究課題の目的

上記中長期的研究計画の①を達成する。具体的にはウイルスベクターと遺伝子改変マウスを用いて内側毛帯線維再配線を可視化し、再配線の時間経過を追跡する。感覚神経切断の影響を大きく受けると考えられる三叉神経第二枝（V2）領域内側毛帯線維に特に着目する。

2. 研究の計画・方法

（1）逆行性神経トレーサーを用いた新規投射線維の起源同定

三叉神経第二枝切断後に第二枝領域視床（V2 VPM）に新規投射する求心性線維の起源を同定するため、V2 VPMに逆行性神経トレーサーを注入した。仮説として“通常は腹側三叉神経主知覚核（V2 Pr5）が特に強く標識される一方、切断動物では背側三叉神経主知覚核（V3 Pr5）も標識されるようになる”ことを想定した。

（2）身体地図可視化マウスを用いた視床内身体地図の経時変化解析

遺伝子改変マウスを用いて、三叉神経第二枝切断後における二枝領域内側毛帯線維束の構造的変化とその時間経過を検討した。仮説として、“二枝領域内側毛帯線維が退縮する一方、それ以外の求心性線維が二枝領域視床に侵入する”ことを想定した。まず切断1週間後を検討した。

3. 研究の特色

当該研究の特色および社会貢献性

本研究はマウスを用いた研究から幻肢痛神経基盤の解明とその治療法開発を目指している。マウスを用いることにより侵襲を伴う実験また遺伝学的ツールのメリットを享受できるため、幻肢痛神経基盤の解明を格段に推し進めることが出来ると考えられる。幻肢痛は頻発する疾患であるのにも関わらずその神経基盤が未知であり、有効な治療法が存在しない。本研究課題により、新生回路を遺伝学的ツールにより抽出できれば、光遺伝学的技術により新生回路が痛みを生じるか検証でき、さらには新規疼痛回路の形成・維持に関わる分子を検討することが可能になる。したがって本研究課題は幻肢痛の新規治療法開発の端緒となる可能性がある。

4. 研究の成果

(1) 逆行性神経トレーサーを用いた新規投射線維の起源同定

まずウイルストレーサー [Kato S et al (2011a,b) Hum Gene Ther 22: 197-206, 1511-1523] を用いて検討したが力価を精度良く調節することが困難であった。そのため最終的にコレラトキシンBサブユニットで検討したところ、奏効した (雑誌発表4)。切断動物では、想定したV3 Pr5に加えて後索核群も新規投射線維の異所性起源と同定された (学会発表2-4)。

(2) 身体地図可視化マウスを用いた視床内身体地図の経時変化解析

V2 Pr5由来の内側毛帯線維に特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成し、神経切断一週間後のV2 VPM内求心性線維を検討した。すると想定したように、V2 Pr5由来内側毛帯線維終末が減少し、非V2 Pr5由来求心性終末が増加していた (学会発表2-4)。この変化は切断一ヶ月後にさらに顕著になっていた。

成果発表

[雑誌発表] (計4件)

1. Sasaki R, Matsumine H, Watanabe Y, Takeuchi Y, Yamato M, Okano T, Miyata M, Ando T (2014) Electrophysiological and functional evaluations of regenerated facial-nerve defect with a tube containing dental pulp cells in rats. Plast Reconstr Surg (in press). (査読有)
2. Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Sakurai H, Miyata M, Yamato M (2014) Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. Plast Reconstr Surg (in press). (査読有)
3. Matsumine H, Sasaki R, Takeuchi Y, Miyata M, Yamato M, Okano T, 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)
4. Takeuchi Y, Asano H, Katayama Y, Muragaki Y, Imoto K, 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)

[学会発表] (計6件)

1. Takeuchi Y, Katayama Y, Miyata M (2014.11.15-19) Functional synapse elimination plays a role in large-scale somatotopic refinement in the sensory thalamus of developing

(様式3) 研究成果

- mice. Neuroscience 2014 (Washington DC, USA).
2. Takeuchi Y, Miyata M (2014.9.11) Large-scale somatotopic reorganization via remodeling of thalamic afferent synapses after peripheral sensory nerve injury. 第37回日本神経科学学会大会 (神奈川県) パシフィコ横浜. (招待有)
 3. Takeuchi Y, Katayama Y, Miyata M (2014.9.11-13) A neural circuit mechanism of large-scale somatotopic reorganization in the thalamus after transection of the whisker sensory nerve of mice. 第37回日本神経科学学会大会(神奈川県) パシフィコ横浜.
 4. Takeuchi Y, Katayama Y, Miyata M (2014.3.16) 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 (鹿児島県) 鹿児島大学.
 5. Takeuchi Y, Miyata M (2013.6.22) 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 (京都府) 国立京都国際会館.
 6. Takeuchi Y, Miyata M (2013.8.24) 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」 (東京都) 順天堂大学.