

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18331

研究課題名(和文) 抗てんかん作用を発揮するカンナビノイド依存性シナプス可塑性の解明

研究課題名(英文) Roles of endocannabinoid-dependent plasticity in anti-epileptic effects

研究代表者

橋本谷 祐輝 (Hashimotodani, Yuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：50401906

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)：海馬歯状回において苔状細胞と顆粒細胞が形成する興奮性シナプスでのCB1受容体の活性化がてんかん発作を抑えることが知られていた。しかし、その機構の詳細は不明である。本研究では、苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおける長期のシナプス可塑性が抗てんかんに寄与する可能性の検討を行った。電気生理学および光遺伝学的手法によって、苔状細胞-顆粒細胞シナプス応答を記録し、様々な刺激条件を検討した。その結果、長期抑圧と長期増強という二つの相反するシナプス可塑性を見いだした。特に長期増強においてはシナプス前部でのcAMP/PKAシグナルが必須であることを明らかにした。今後てんかんと関連を調べていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In the dentate gyrus of hippocampus, excitatory mossy cells and granule cells make reciprocal connections. It is known that these circuits are important for anti-epileptic effects through CB1 receptor activation. It is expected that CB1 receptor-dependent form of synaptic plasticity may contribute to this effect. However, precise mechanisms are still unclear. Here, we examined whether mossy cell-granule cell synapses shows any kinds of long-term synaptic plasticity. By using electrophysiological and optogenetic methods, we found that this synapse exhibited both LTD and LTP. We further found that this LTP requires presynaptic cAMP/PKA signaling. How these long-term synaptic plasticities contribute to anti-epileptic effects will be investigated in the future study.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬歯状回 苔状細胞 内因性カンナビノイド シナプス可塑性 LTP

1. 研究開始当初の背景

海馬は記憶・学習に必須の脳領域であり歯状回-CA3-CA1 という3つのシナプスで形成される回路における情報処理はこれまでよく調べられてきた。いっぽう歯状回には局所回路も存在する。海馬歯状回の苔状細胞と顆粒細胞はいずれもグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンであり、相互にシナプス結合し、ポジティブフィードバックループを形成している(図1)。苔状細胞は歯状回分子層のうち最も内側の層にだけ選択的に投射しており、さらに同じ層の顆粒細胞だけでなく、海馬の長軸方向にも投射する。さらには、対側の海馬歯状回にも投射する。すなわち非常に広い範囲の顆粒細胞とシナプスを形成し、

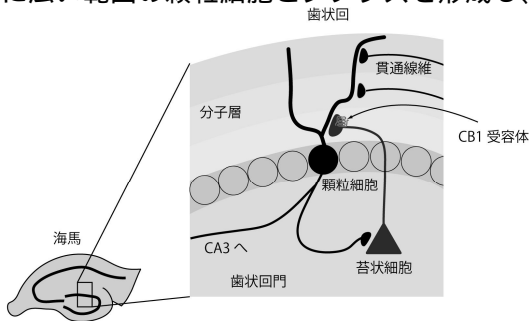


図1 海馬歯状回における局所回路

歯状回の主要細胞である顆粒細胞は軸索を CA3 に投射するとともに側枝を歯状回門の興奮性細胞である苔状細胞にも伸ばす。苔状細胞は顆粒細胞とシナプスを形成しポジティブフィードバックループを形成する。

苔状細胞-顆粒細胞シナプスの前部に CB1 受容体が局在する。

その興奮を制御することが予測される。このように非常に興味深い投射パターンを示していることからこの回路が記憶・学習に重要な役割を果たす可能性がこれまで議論されてきた。しかし苔状細胞と顆粒細胞の回路が海馬の情報処理においてどのような役割を担っているのか?さらにはシナプス可塑性の有無等ほとんど明らかでなかった。

いっぽうで、病理学的には苔状細胞がてんかん発作と強い関連のあることが知られていた。苔状細胞と顆粒細胞で形成されるシナプスのシナプス前終末、すなわち苔状細胞の軸索末端の神経終末部に局在する CB1 受容体の活性化がてんかんを抑える働きがあることが報告されていた。しかしそのメカニズムは不明である。

CB1 受容体はそのリガンドである内因性カンナビノイドによって活性化される。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞で作られて、逆行性シグナルとして働きシナプス前終末に局在する CB1 受容体を活性化させることがよく知られている。この内因性カンナビノイドによる逆行性シグナルは短期あるいは長期にシナプス伝達を調節する。特にシナプス伝達の効率が長期にわたって増強する長期増強 (long-term potentiation; LTP) あるいは低下する長期抑圧 (long-term depression; LTD) の誘発に CB1 受容体が寄与

する例が多く報告されている。したがって、苔状細胞-顆粒細胞シナプスでの CB1 受容体の活性化によって LTP や LTD といったシナプス可塑性が引き起こされた結果、顆粒細胞の興奮性が変化し抗てんかんへとつながる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおけるシナプス可塑性に焦点を当てる。

(1) まず、どのような刺激によって長期のシナプス可塑性が発揮されるのか明らかにする。(2) さらにそのメカニズムを解明する。(3) 最後に内因性カンナビノイドシグナルとの相互作用を調べ、抗てんかんにどのように結びつくのかを検討する。

3. 研究の方法

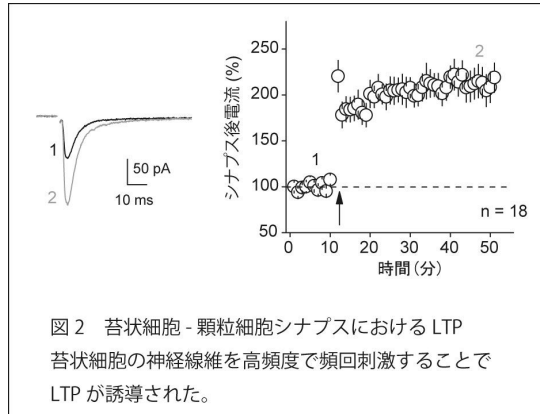
実験にはマウスの急性海馬スライス標本を用いた。パッチクランプ法により、海馬歯状回の顆粒細胞からホールセルパッチクランプし、ホールセル電流を記録した。苔状細胞の神経線維を刺激するために刺激電極は分子層の最内側部に設置して、シナプス応答を誘発した。分子層の外層と中層は嗅内皮質からの投射が来ており、これらの入力グループ II 代謝型グルタミン酸受容体のアゴニスト DCG-IV に感受性がある。一方、苔状細胞の神経線維は DCG-IV 非感受性であるため、各実験の最後に DCG-IV を投与して刺激された応答に嗅内皮質からの投射が混じっていないことを確認した。さらにより選択的に苔状細胞の神経線維を刺激するために光遺伝学的手法も使った。苔状細胞が対側の海馬歯状回にも投射していることを利用して、片側の歯状回門にアデノ随伴ウイルスを用いて、チャンネルロドプシン-2 (ChR2) を発現させて、対側の海馬スライスを実験に用いた。

4. 研究成果

まず初めに内因性カンナビノイド依存性の LTD を誘発する目的で、苔状細胞の神経線維を低頻度で持続的に刺激した。このような刺激条件では一過性のシナプス応答抑制は見られたが、長期の LTD には至らなかった。そこでメタ可塑性の可能性を検討するためにグループ I 代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストである DHPG を 10 分間投与した後に、同じように低頻度刺激を行った。このような条件では苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおいて LTD が観察された。この LTD が CB1 受容体依存性であるかどうかに関しては、現在まだ検討中である。さらに、このようなメタ可塑性とてんかんの関わりを現在検討中である。プライミング刺激としての DHPG をてんかん誘発に置き換えて同じような LTD が起るか調べる。

この LTD 実験での条件検索の過程で、低頻度とは逆に高頻度で刺激すると予想外に LTP が誘導された(図2)。この LTP は NMDA 受容

体非依存的であり、シナプス前性の変化で引き起こされることがわかった。LTP のメカニズムをさらに詳しく調べるために PKA の阻害剤で処理すると LTP が起らなくなった。さらにアデニリルシクラーゼのアクティベータであるフォルスコリン投与で LTP 様の現象が観察された。このフォルスコリンによるシナプス応答の増強も LTP 同様にシナプス前性の変化を伴っていた。そこで LTP とフォルスコリンによるシナプス応答の増強が同一のシグナルカスケードによって引き起こされているのかを検討するために、はじめに LTP を誘導してからフォルスコリン投与を行った

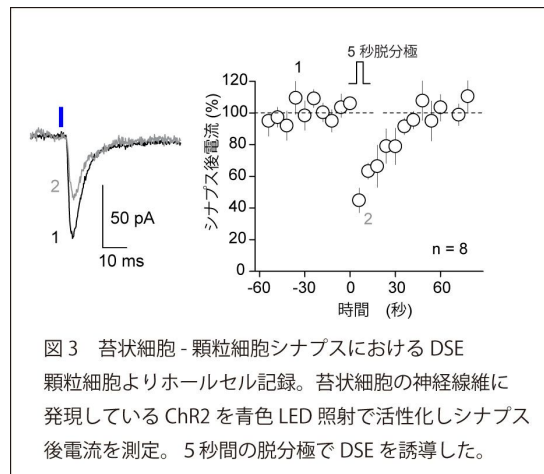


が増強は起らなかった。逆にフォルスコリンを投与した後に、LTP 誘導刺激を与えてもやはり LTP は起らなかった。すなわち両者はシグナルカスケードを共有しており、cAMP/PKA シグナルが必須であることがわかった。

上述の実験では電気刺激によってシナプス伝達を誘発していた。この方法では他の神経線維も刺激している可能性があり、それが LTP 誘導に寄与する可能性が排除できない。そこで、より選択的に苔状細胞の神経線維だけを刺激するためにアデノ随伴ウイルスを用いて ChR2 を苔状細胞に発現させた。苔状細胞が対側の海馬歯状回にも投射することを利用してウイルスを注射していない逆側の海馬スライスを使用した。ChR2 に融合させた蛍光タンパク質 eYFP が歯状回分子層の最内側部のみ観察されたので ChR2 を発現した苔状細胞が対側の顆粒細胞に投射していることがまず確認された。顆粒細胞で記録を行い、青色 LED 照射で ChR2 を活性化させると EPSC が測定された。この光照射による EPSC が苔状細胞からの投射によるものかどうかを、DCG-IV に対する非感受性で確かめた。さらに検証するために内因性カンナビノイドシグナルを調べた。苔状細胞の神経終末には CB1 受容体が発現しているため、アゴニスト投与によってシナプス伝達の抑制が起ることが期待される。実際 CB1 受容体のアゴニストである WIN55,212-2 を投与すると EPSC の抑制が観察された。さらに脱分極で誘導される内因性カンナビノイドシグナルとして知られている depolarization-induced suppression of excitation (DSE) を調べた。DSE も光照射による EPSC で誘導されることを

確認した(図3)。以上の実験結果から、光照射によって記録される EPSC は苔状細胞-顆粒細胞シナプス由来のものであることがわかった。

以上の確認実験の後、電気刺激誘発と同様に光照射によっても LTP が誘導されるかどうか調べた。その結果、光照射でも苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおいて LTP が起ることを見いだした。2 発刺激による応答の比を比べる、いわゆる paired pulse ratio を調べると比が LTP 後に減少しており、電気刺激誘発と同様にシナプス前性の変化が示唆された。さらにフォルスコリン投与でも光照射による EPSC の増強が起った。以上の結果から、



光遺伝学を使ったより選択性の高い刺激条件でも LTP が起ることが明らかになった。このことは、LTP 誘導には苔状細胞の神経線維活動のみが必要で他の入力は全く必要としないことを示唆している。

最後に LTP 誘導に内因性カンナビノイドシグナルが寄与するかどうかを CB1 受容体のアンタゴニストである AM251 存在下で調べた。AM251 存在下でもコントロールと同じように LTP が誘導されたことから内因性カンナビノイドシグナルは LTP の誘導に寄与しない結果となった。今後上述の LTD と LTP の相互作用を調べそこに内因性カンナビノイドシグナルが関与する可能性について調べたい。

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. Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimoto Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe

T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M.
(2016) Emerging roles of
ARHGAP33 in intracellular
trafficking of TrkB and
pathophysiology of
neuropsychiatric disorders.
Nature Communications 7:10594
(査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

橋本谷祐輝 海馬歯状回局所回路における
シナプス可塑性 第 21 回グリアクラブ 北
海道小樽市 2016 年 2 月 1 日～3 日

〔図書〕(計 1 件)

橋本谷祐輝 「ブレインサイエンス・レビュ
ー2018」ブレインサイエンス振興財団編
(分担) 2018 年発行予定

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 神経生理学
分野ホームページ
http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本谷 祐輝 (Yuki Hashimotodani)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50401906

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()