

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0318

研究課題名（和文）発達期バレル皮質の神経回路形成におけるカンナビノイド依存性シナプス可塑性の役割（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Role of the cannabinoids-dependent synapse plasticity in the neural circuit formation in developing mouse somatosensory cortex(Fostering Joint International Research)

研究代表者

伊丹 千晶（ITAMI, CHIAKI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：90392430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：齧歯類のバレル皮質を用いて、生直後（P0）以降、視床皮質投射形成とその過形成からの退縮（P5以降）、P6以降の4層-2/3層投射形成に、それぞれ異なる神経活動依存的可塑性、すなわち異なるスパイクタイミング依存性可塑性（STDP）が関与することを明らかにした。更に視床皮質投射の過形成からの退縮にはカンナビノイド受容体（CB1R）を介したSTDPが関与すること、またP12-15以降、L4-L2/3シナプスでもCB1Rが関与したSTDPが出現することで臨界期が開始する事を示し、皮質内回路形成から臨界期開始に至るまでのモデルを初めて提示する事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の臨界期可塑性の研究は、言語獲得等にも同様の臨界期がある事が明らかにされると、大脳皮質の学習のメカニズムに繋がると考えられ、膨大な実験がなされたが、臨界期全体がどのように進んでいくのかという全体像は不明瞭なままであった。我々は投射回路形成と可塑性を調べる一連の研究により、視床皮質投射形成からいかにして臨界期開始に至るかを説明するモデルを始めて提唱し、臨界期のメカニズムの解明に大きく寄与することができた。また、このメカニズムにカンナビノイドが深く関与していることを明らかにしたが、しばしば乱用される大麻が大変危険であると言うことに科学的根拠を加えたという点においても、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In the rodent barrel cortex, multiple forms of STDP appear sequentially during development, and they contribute to thalamocortical circuit formation, retraction, or fine-scale functional reorganization. Furthermore CB1-dependent STDP appears at L4-L2/3 synapses starting at postnatal day 15. It mediates activity-dependent, fine-scale circuit refinement, essential for the critical period in the barrel cortex. Thus, we could propose a hypothesis for the first time that explains the transition from network formation to the initiation of the critical period in the barrel cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：critical period barrel cortex STDP CB1R

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

カンナビノイド(CB)は従来、その精神的作用にのみ注目されてきたが、近年大脳皮質や海馬、小脳においてシナプス可塑性を引き起こす伝達物質として新たな注目を受けた。パレル皮質においては、4層 2/3層シナプスの長期抑圧(LTD)にCBが関与しており、臨界期の活動依存的な生理学的、形態学的可塑性に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、これまでにカンナビノイド受容体(CB1R)欠損マウスを用いて、臨界期前の生後7-14日(P7-14)のL4-L2/3シナプスにおいて、従来のスパイクタイミング依存性可塑性(Hebbian STDP)とは異なる長期増強だけのSTDP(all-LTP STDP)が働き、その後LTDを獲得し、Hebbian STDPとなり、そのことが臨界期開始のメカニズムである可能性を示した。パレル皮質では生後数日までに活動依存的にwhisker mapが形成されるが、そのメカニズムは明らかにされていない。視床皮質投射は、生直後に一時的に表層まで広がるが、直ぐに4層までに退縮することも知られているが、そのメカニズムは知られていない。

## 2. 研究の目的

CBは、大脳皮質や海馬、小脳において短期的可塑性や長期抑圧(LTD)に関与するretrograde signalとして示されている。パレル皮質においては、L4-L2/3シナプスの長期抑圧(LTD)に関与していることが報告されているが、入力依存的な軸索の退縮、刈り込みに関与しているという報告はない。本研究はCBと軸索の退縮、刈り込みの関連を、まず視床皮質投射において明らかにし、CBがSTDPと神経回路形成のメカニズム、及び両者の関連に重要な関わりを持つ可能性を検証する。次に、4層-2/3層投射においても生後12日以降にCB1Rを発現することから、この投射においてもCB1Rが軸索刈り込みの効果を持つかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

これまでに我々は、臨界期前(生後2週目)の動物では4層 2/3層間に、臨界期中に見られるSTDPとは異なるタイプのSTDPが発現され、STDPのスイッチが臨界期開始を導いている可能性を明らかにした(J. Neurosci. 2012)。これは長期増強だけのSTDP(all-LTP STDP)であり、この時期が4層 2/3層投射形成期であることを考えると、視床皮質投射においても投射形成期に同様のall-LTP STDPが働いている可能性があり、その後STDPが別のタイプに変わることで、回路形成が進んでいる可能性がある。

### (1) 視床 皮質投射の生後発達

視床にGFPを発現しているRORGFPマウス(Hui-Chen Lu博士からマウスの提供を受け、実験は彼らの研究室で実施した)を用いて、視床 皮質投射の生後発達を明らかにする。ここでは、生直後に視床からの軸索投射が皮質第2/3層にまで拡大しているかどうか、また、生後7日までに退縮し、皮質第4層内に限局しているかどうかを観察する。我々の生理実験の結果からは、この退縮はCB1受容体の作用と考えられるので、CB1受容体の拮抗薬であるAM281の腹腔投与により、視床軸索の退縮が阻害できるかどうかを検討する(先行研究によりAM281の腹腔投与は血液脳関門を通過することが知られている)。Dilを視床細胞に導入し、ニューロシダを用いて解析を行う。

### (2) 視床皮質投射のSTDPの検討

視床 2/3層シナプスのSTDPの発達に伴う変化を電気生理学的に検討する。視床皮質投射退縮

期にはLTPのみのSTDPがあるとは考えられないので、生後1週目内にSTDPがスイッチする可能性が非常に高い。同様に、視床-4層へはSTDPがあるのかどうかを検討する。

### (3) CB1受容体作動薬(WIN, THC)および拮抗薬(AM281)投与による4層-2/3層投射の形態変化

4層-2/3層投射はシナプス形成期にall-LTP STDPを示し、生後12-15以降にCB1R依存性のLTDが附加し、LTP-LTD型のHebbian STDPとなることを、以前我々は示した。生後12日以降の4層終末のCB1Rが軸索退縮効果を持つとすれば、4層細胞のコラム状投射に關与する可能性がある。これを検討するために生後12-17日において、CB1受容体作動薬(WIN、Natural アゴニスト<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabinol(THC))及び、拮抗薬(AM281)を投与し、4層細胞の形態を観察する。携帯観察のために、P17-21にスライス標本を作製し、ホールセル記録によるNeurobiotinを注入し、コンフォーカル像を比較する。

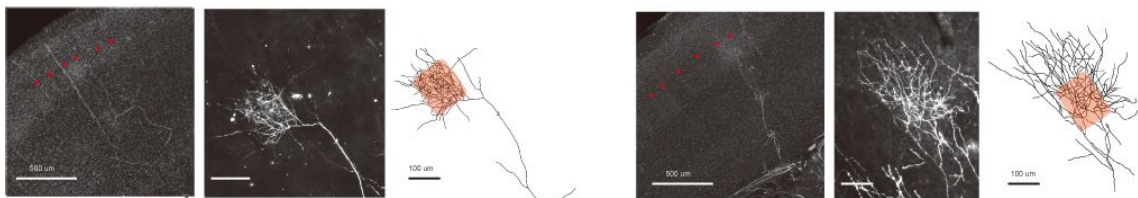
## 4. 研究成果

### (1) 視床 皮質投射の生後発達

視床にGFPを発現しているRORGFPマウスを用いて、視床皮質投射の軸索を蛍光観察し比較した。我々の生理実験の結果から生直後、視床からの軸索投射が皮質第2/3層にまで拡大し、7日までに退縮し皮質第4層内に限局していることが期待されたが、確かにその傾向が見られた。これを更に精査するために、視床皮質投射が保存されているスライス(TCスライス)を固定し、視床にDilクリスタルを置き、個々の視床皮質の軸索ターミナル(TCA)蛍光で可視化し、コンフォーカルで可視化した。その結果、TCA投射領域は、個々のパレル内に限局して分岐していることが分かった。

CB1R +/+

CB1R -/-



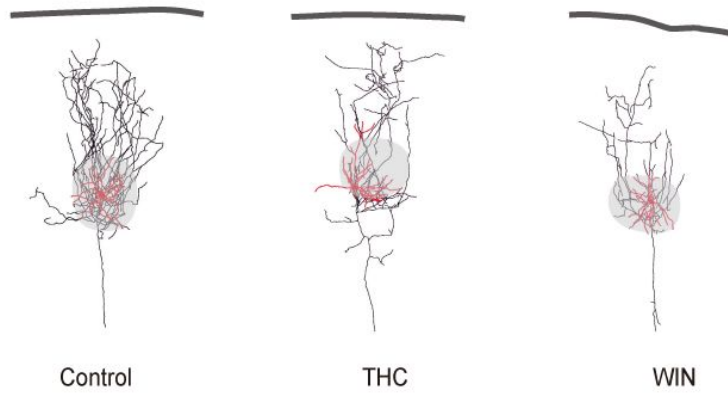
### (2) 視床皮質投射のSTDPの検討

生直後、まだ視床皮質(板)投射の形成期にはL4-L2/3投射と同様にLTPだけのSTDP(all-LTP STDP)が見られた。生後4日ごろ、4層のパレルが明確に形成され、2/3層が分化すると、all-LTP STDPの強度は減少し、生後7日以降は、視床-2/3層投射はall-LTD STDPへと変化していった。このall-LTD STDPは2/3層形成による、視床から2/3層への過剰投射の退縮に關与していると考えられる。また、このall-LTD STDPはCB1Rの作動薬、阻害薬の感受性、CB1R-KOを使った実験から、CB1Rを介するものである事が判明した。一方、視床-4層投射はSTDPを消失しており、視床の本来の投射先である4層への投射の固定に貢獻していると考えられる。

### (3) CB1受容体作動薬(WIN, THC)および拮抗薬(AM281)投与による4層-2/3層投射の形態変化

生後12-17日のC57BL6マウスにおいて、(1)と同様に、WIN、および<sup>9</sup>-THCを腹腔投与した。P17-21にスライス標本を作製し、4層spiny stellateにホールセル記録によるNeurobiotinを注入し、軸索投射を可視化し、コンフォーカルで蛍光観察した。CB1R作動薬(WINおよびTHC)投

与群では、total axon length が減少していたが、軸索のカラム状投射には変化がなかった。このことから、CB1R は4層 2/3層の軸索投射に対して剪定効果を持つことが示された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fumitaka Kimura, Chiaki Itami	4. 巻 39
2. 論文標題 A hypothetical model concerning how spike timing-dependent plasticity contributes to the neural circuit formation and the initiation of critical period in barrel cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3784-3791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1684-18.2019">https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1684-18.2019</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohshima Minoru, Itami Chiaki, Kimura Fumitaka	4. 巻 595
2. 論文標題 The 2A-adrenoceptor suppresses excitatory synaptic transmission to both excitatory and inhibitory neurons in layer 4 barrel cortex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 6923 ~ 6937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP275142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itami C, Huang JY, Yamasaki M, Watanabe M, Lu HC, Kimura F.	4. 巻 36
2. 論文標題 Developmental Switch in Spike Timing-Dependent Plasticity and Cannabinoid-Dependent Reorganization of the Thalamocortical Projection in the Barrel Cortex	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7039-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.4280-15.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Itami C, Kimura F	4. 巻 44
2. 論文標題 Concurrently Induced Plasticity Due to Convergence of Distinct Forms of Spike Timing-Dependent Plasticity in the Developing Barrel Cortex	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Eur J Neurosci	6. 最初と最後の頁 2984-2990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.13431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Chiaki Itami, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Effects of exogenously administered cannabinoid agonists on axonal projection of layer 4 neurons in the developing mouse barrel cortex
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 発達期マウスバレル皮質4層細胞軸索投射に対するカンナビノイド作動薬投与の効果
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumitaka Kimura., Chiaki Itami, Kenji Sakimura, Masanobu Kano
2. 発表標題 The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is required for neuronal circuit formation in the developing barrel cortex
3. 学会等名 FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村文隆、大島稔、伊丹千晶
2. 発表標題 マウスバレル皮質4層細胞への視床及び2/3層からの興奮性入力は2A受容体を介してシナプス前性に抑制される
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 文隆, 伊丹 千晶, 崎村 建司, 狩野 方伸
2. 発表標題 内因性カンナビノイド、2-アラキドノイルグリセロールはマウスのバレル皮質の視床皮質投射、4層 - 2/3層投射において重要な役割を果たす
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fumitaka Kimura, Minoru Ohshima, Chiaki, Itami
2. 発表標題 The a2A adrenoceptor suppresses excitatory synaptic transmission to both excitatory and inhibitory neurons in layer 4 barrel
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Effects of cannabinoid agonists on axonal projection of layer 4 neurons in the developing mouse barrel cortex
3. 学会等名 第41回神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is required for neuronal circuit formation in the developing barrel cortex
3. 学会等名 FENS Forum 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Effects of exogenously administered cannabinoids on axonal projections of L4
3. 学会等名 SfN 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Itami C, Sakimura K, Kano M, Kimura F
2. 発表標題 Physiological and morphological roles of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the developing neuronal circuit in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 SfN 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kimura F, Itami C, Huang JY, Yamasaki M, Masahiko W, Lu HC
2. 発表標題 Developmental Switch in Spike Timing-Dependent Plasticity and Cannabinoid-Dependent Reorganization of the Thalamocortical Projection in the Barrel Cortex
3. 学会等名 FENS Forum 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊丹千晶、崎村建司、狩野方伸、木村文隆
2. 発表標題 マウスのバレル皮質神経回路発達における内因性カンナビノイド、2-アラキドノイルグリセロールの役割
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2016年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----