

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590247

研究課題名 (和文) ニコチンによる海馬シナプスのリモデリング

研究課題名 (英文) Nicotine-induced remodeling of synapse in hippocampal neuron.

研究代表者

田中 秀和 (TANAKA HIDEKAZU)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70273638

研究成果の概要(和文):ニコチンによるシナプスの形態変化を明らかにした。海馬神経細胞を、クラゲ蛍光蛋白質 GFP で可視化し、シナプス後構造であるスパインの形態変化を追った。ニコチン添加 1-2 時間後、きのこ型をしたスパインの頭部から、数ミクロンの長さの針状の突起が伸展した。この結果から、シナプスが幼若化し、ある種のシナプスのつなぎかえによる神経回路網 (脳) のリモデリングが、ニコチン依存性の一因となっていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Nicotine was discovered to induce synaptic remodeling. The remodeling of dendritic spine, the postsynaptic structure, was visualized with green fluorescent protein (GFP) in cultured hippocampal neurons. One-two hours after the application of nicotine, a several micrometer-long filopodia protruded from the head of mushroom-shaped spine. This unique remodeling of spine head suggests a kind of the destabilization of synaptic connection, which may result in the rewiring of neural circuit. This phenomenon might be one of the mechanisms underlying the nicotine addiction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢神経・ニコチン・シナプス・可塑性・スパイン・認知症・薬物依存・海馬

1. 研究開始当初の背景

喫煙による健康被害が周知されるようになった昨今ではあるが、ニコチン (Nicotine) による依存性形成が、喫煙コントロールの大きな障害のひとつとなっている。近年ニコチンが依存性薬物として認知されるようになってきたにも関わらず、ニコチンによる依存性形成のメカニズム、なかでも、脳神経系のリモデリングについては、多くの部分がわかっておらず、未知の領域といっても過言ではない。

中枢ならびに末梢神経系、神経筋接合部において、神経伝達に中心的な働きをする神経伝達物質としてアセチルコリンがある。アセチルコリンの受容体は、主に副交感神経からの伝達を受容するムスカリニック・アセチルコリン受容体と、自律神経節や神経筋接合部での伝達を受容するニコチニック・アセチルコリン受容体の2種類に、大きく分けられる。脳内にはこれら両者が存在し、脳内のアセチルコリン作動性神経終末から分泌されたアセチルコリンにより、神経活動の制御を受け

るとともに、喫煙によって血液脳関門を通過したニコチンの作用点ともなっている（脳内ニコチン・アセチルコリン受容体）。

脳内ムスカリニック受容体刺激は、脳全体の活動性と関連しており、脳内アセチルコリンの分解を阻害するアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を投与することにより、認知症の改善に一定の効果が認められている。一方、身体運動の滑らかさを制御する錐体外路系の線条体内での、ドーパミン欠乏によって引き起こされるパーキンソン病（振戦麻痺）では、相対的なアセチルコリン優位状態が起こっており、ムスカリニック・アセチルコリン拮抗薬で、症状が改善される。しかしながら、脳内ニコチン・アセチルコリン受容体の生理的意義は不明であり、各種病態・依存性形成との関連性についても、明確なことはわかっていない。

近年分子生物学の進歩により、脳内ニコチン・アセチルコリン受容体の実体が分子同定（クローニング）され、末梢におけるのと同様、陽イオンチャンネルを形作っていることがわかってきた。例えば、情動・記憶の座と呼ばれる海馬においては、 $\alpha 7$ 型ニコチン・アセチルコリン受容体（ $\alpha 7nAChR$ ）が主に発現している。しかしながら、これら受容体が担う機能については、近年電気生理学的手法により、シナプスの可塑性に関与しているという報告が、ようやくなされてきたに過ぎない。

例えば海馬錐体神経細胞には、グルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性シナプスが形作られている。海馬の神経回路網の構築は、非常に明快であり、神経機能、なかでもシナプス可塑性についての研究モデルとして、最も適した材料を提供してきた。この海馬興奮性シナプスのシナプス前終末（シナプス前膜）、そしてそこからの化学的シナプス伝達を受け取る樹状突起スパイン（シナプス後膜・シナプス後肥厚）両側に、 $\alpha 7nAChR$ が存在する。この受容体をニコチンにより刺激することにより、主には、シナプス前終末の過程を介して、グルタミン酸によるシナプス伝達の効率が修飾される。

2. 研究の目的

このように、海馬神経細胞を例として、脳内ニコチン・アセチルコリン受容体がシナプス可塑性に関与することがわかってきつつあるが、ニコチン連用による長期の変化や、神経回路網のリモデリング（再構築）については、まだ調べられていない。そこで、本研究計画では、ニコチンによって海馬神経細胞を刺激したときに起きる、神経回路網のかなめ「シナプス」の形態変化に的を絞って、細胞生物学的なメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

我々は以前の研究で、海馬錐体神経細胞のグルタミン酸シナプスをモデルとして、シナプス可塑性によるシナプスの形態変化についての検討を行ってきた。興奮性神経伝達物質グルタミン酸をシナプス小胞に蓄えた軸索終末部（シナプス前膜）が、樹状突起から突出したスパイン（シナプス後膜）に化学的神経伝達を行う。スパインは樹状突起表面に突出したキノコ型の構造物で、茎にあたる部分が細く、傘にあたる頭部（直径1ミクロン大）に、神経伝達物質受容体が局在し、アクティゾーンを形成している。蛍光タンパク質GFP遺伝子を導入したラット海馬培養神経細胞を用いて、倒立蛍光顕微鏡観察を行うと、スパインの形態が明瞭に観察される。そこで、生きた神経細胞の経時的連続（タイムラプス）撮影を行うと、スパインは、非常に活発に運動する構造物であることが判明した。そして、グルタミン酸によるシナプス伝達が起こっている最中は、スパインが動きを止め、収縮した。それに引き続く刺激からの回復により、30分をピークとして超回復し、刺激前よりも横幅が拡大し、結果として、シナプス前・後膜の接着部分が拡大することもわかった。このように、我々の実験系では、神経活動によるシナプスのつなぎ変え・リモデリングを明らかにすることができる。この実験系を用いて、ニコチンによるシナプス・スパインのリモデリングを観察する実験を行った。

4. 研究成果

(1) 実験系の構築

シナプスの形態的可塑性を検討するために、ラット海馬神経細胞を培養し、それに遺伝子導入を行うことで、クラゲ由来の蛍光蛋白質GFPを発現させた。神経細胞の細胞質内を速い速度で拡散するGFPの蛍光により、神経細胞の形態が経時的に観察できるようになった。シナプスの機能・形態連関を考察する為に、樹状突起表面に突出し、シナプス後構造を形作るスパインの形態に着目し、経時的にスパインの形態変化を追った。細胞外液に30mMのカリウムイオンを入れることにより細胞膜の脱分極を起こし、シナプスを刺激した。刺激中はスパインが安静時に見せる速い（数秒に1回のサイクル）反復運動が止まり、スパインが丸く小さくなった。その後、刺激を取り除くとすぐにもとの状態にもどるが、15分程で、今度は安静時よりも大きく広がった形に変形し、シナプスの接着面を拡大させた。

(2) ニコチンによるスパイン形態変化

ニコチンを長時間作用させることによるスパインの形態と運動パターンの変化を観察した。GFPで可視化した培養ニューロンを

維持している Tyrode's 溶液中に、各種濃度のニコチンを添加し、5分ごと、最大2時間にわたるスパイン形態の変化を追った。その結果、通常、ニコチン・アセチルコリン受容体を活性化するのに必要な濃度よりも、比較的高濃度 (2-5 microM) のニコチン存在下で、きのこ型をしたスパインの頭部から、細長い形をした針状の突起が、1本から数本伸展する姿が観察された。この変化が起こるまでにかかる時間は一定ではなく、ニコチン添加後、60分から120分の間に、90分をピークとして、確率的に分布した。この形態変化から、シナプスが幼若化し、シナプス結合が弱まる可能性が示唆された。

(3) 特異性と受容体の特定

上記で観察した形態変化の再現性を確認する為に、条件を様々に変化させながら、ニコチンによるスパイン形態変化の観察を繰り返し、現象の確実性を確認した。また動物種を変え、マウスの培養神経細胞でも同じ現象がおこることを確認することが出来た。

次にこの現象が、脳内のニコチン・アセチルコリン受容体を介するメカニズムで起きることを確かめた。すなわち、ニコチン受容体の拮抗薬 Mecamylamine 存在下では、ニコチンによるスパイン形態変化は阻害された。さらに、 $\alpha 7nAChR$ の特異的拮抗薬である Methyllycaconitine (MLA) でも阻害され、 $\alpha 7nAChR$ を介するメカニズムが示唆された。

(4) スパインリモデリングのメカニズム

$\alpha 7nAChR$ はカルシウムイオン透過性の受容体であるが、シナプス前細胞に存在して、シナプス伝達を調節すると言われている。我々の実験系において調節されるシナプスは、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスが主であると考えられるので、グルタミン酸受容体の拮抗薬存在下で、ニコチンを作用させた。その結果、スパインの針状形態変化は、抑制される傾向が見られたが、部分的に変化が残った。従って、ニコチンによるスパイン形態変化は、シナプス前細胞への作用を介すると考えられるが、一部シナプス後細胞 (スパイン) への直接作用が関与している可能性もある。シナプス後細胞の $\alpha 7nAChR$ を活性化することで、スパイン内細胞内カルシウム濃度に変化を引き起こし、細胞骨格のリモデリングを制御する経路もあるのかも知れない。

(5) 生体内に近い条件での検討

以上の実験は、培養ニューロンを用いたものであり、シナプスの周囲は培養液に浸された空間である。しかしながら我々の脳内では、シナプスの周囲に空虚な空間は無く、シナプス近傍を星状膠細胞が取り巻いているので、異なる挙動を示す可能性がある。そこで、より生体に近い条件での観察を行うために、海

馬生切片内の神経細胞を観察した。神経細胞樹状突起スパインの形態を可視化するために、海馬錐体神経細胞の約10%に蛍光蛋白質 YFP を発現するトランスジェニックマウスを用い、厚さ 400 μ m の海馬生切片を作製し、二光子レーザー顕微鏡で観察を行った。二光子レーザーを用いることにより、切片内の深い部分にある神経突起の蛍光観察が可能になったが、蛍光感度の限界と、観察すべきスパイン上の針状突起が光の解像度限界に近い細さであることなどから、ニコチンによる形態変化は充分観察するまでには至らず、この点で課題を残した。

(6) 展望

本研究を通して、脳内ニコチン性アセチルコリン受容体による神経回路網のリモデリングが明らかになり、薬物依存現象の理解を進めるための一助となると期待している。また、現在コリンエステラーゼ阻害薬が中心である認知症治療薬の、新たな展開を目指す上での機能評価系としても、本研究成果を生かして行けると期待される。

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13件)

① Yamamoto T, Tanaka H, Kobayashi H, Okamura K, Tanaka T, Emoto Y, Sugimoto K, Nakatome M, Sakai N, Kuroki H, Yamaguchi S, Matoba R. Retrospective review of Japanese sudden unexpected death in infancy: the importance of metabolic autopsy and expanded newborn screening. *Mol Genet Metab.* 102:399-406 (2011). 査読有.

② Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. Non-clustered Protocadherin. *Cell Adh Migr.* volume 5, issue 2, in press (2011). 査読有.

③ Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takigami S, Yamagata K. p38 Map Kinase Inhibitors as Potential Therapeutic Drugs for Neural Diseases. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 11:45-59 (2011). 査読有.

④ Shiraya K, Hirata T, Hatano R, Nagamori S, Wiriyaerkmul P, Jutabha P, Matsubara M, Muto S, Tanaka H, Asano S, Anzai N, Endou H, Yamada A, Sakurai H, Kanai Y. A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in

renal proximal tubules. *J Biol Chem.* 285:22141-51 (2010). 査読有.

⑤ Sugimoto K, Okamura K, Tanaka H, Takashima S, Ochi H, Yamamoto T, Matoba R. Methamphetamine directly accelerates beating rate in cardiomyocytes by increasing Ca²⁺ entry via L-type Ca²⁺ channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 390:1214-20 (2009). 査読有.

⑥ Yagita Y, Sakurai T, Tanaka H, Kitagawa K, Colman DR, Shan W. N-cadherin regulates differentiation of neural precursor cells. *J Neurosci Res.* 87:3331-42 (2009). 査読有.

⑦ Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. Transducing Neuronal Activity into Dendritic Spine Morphology: New Roles for p38 MAP Kinase and N-Cadherin. *Neuroscientist.* 15:90-104 (2009). 査読有.

⑧ Sakamoto S, Chairoungdua A, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Promchan K, Tanaka H, Kimura T, Ueda T, Fujimura M, Shigeta Y, Naya Y, Akakura K, Ito H, Endou H, Ichikawa T, Kanai Y. A novel role of the C-terminus of b 0, + AT in the ER-Golgi trafficking of the rBAT-b 0, + AT heterodimeric amino acid transporter. *Biochem J.* 417:441-8 (2009). 査読有.

⑨ Amonpatumrat S, Sakurai H, Wiriyasermkul P, Khunweeraphong N, Nagamori S, Tanaka H, Piyachaturawat P, Kanai Y. L-Glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative stress. *J Pharmacol Sci.* 108: 280-289 (2008). 査読有.

⑩ 田中秀和、安田 新、杉浦弘子、山形要人. ニューロンの過剰興奮後に生じるシナプス減少のメカニズム. *実験医学* 26(8):1257-1260 (2008). 査読無.

⑪ Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K. Synaptic Activity-induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TAO2 β and p38 MAP Kinases. *Neuron.* 56:456-71 (2007). 査読有.

⑫ Lin X, Ogiya M, Takahara M, Yamaguchi

W, Furuyama T, Tanaka H, Tohyama M, Inagaki S.

Sema4D-plexin-B1 implicated in regulation of dendritic spine density through RhoA/ROCK pathway. *Neurosci Lett.* 428:1-6 (2007). 査読有.

⑬ Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci.* 26:126-33 (2007). 査読有.

[学会発表] (計4件)

① 田中秀和ほか. 海馬神経細胞接着分子 N-cadherin結合蛋白質の網羅的解析. 第118回日本薬理学会近畿部会. 2010.11.19. 大阪.

② Tanaka H, et al. Dynamic roles of proteins in synaptic adherens junction. 第83回日本薬理学会年会. 2010年3月16-18日. 大阪.

③ Tanaka H, et al. Dynamic roles of proteins in synaptic adherens junction. 36th International congress of physiological sciences. 2009年7月27日-8月1日. 京都.

④ 田中秀和. シナプスリモデリングの情報伝達経路の探索. 日本薬理学会近畿部会. 2009年6月26日. 石川.

[その他] (計1件)

① 新聞報道
「学習障害解明に光」
朝日新聞 2007年11月16日科学欄 (ほか各紙) (*Neuron.* 56:456-71 (2007) を紹介).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀和 (TANAKA HIDEKAZU)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 70273638

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: