

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06913

研究課題名（和文）発達期皮質神経回路形成におけるカンナビノイドの役割

研究課題名（英文）The role of cannabinoids in the formation of cortical neural circuits during development.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：円柱状構造は大脳皮質の基本構造であり、高等動物における情報処理の基盤であると考えられている。視床皮質投射の形成直後、カンナビノイド受容体（CB1R）は第4層（L4）軸索終末で機能し始めるが、これはL4軸索の柱状形成のタイミングと一致していた。また、2-AG合成の主要酵素であるジアシルグリセロールリパーゼを遺伝的に欠損させたマウスでは、L4軸索の柱状構造が崩壊していた。CB1Rアゴニストを腹腔内に投与すると軸索の長さが短くなり、L4ニューロンのCB1Rをノックアウトすると軸索の柱状突起が障害された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、神経科学の主要な目標の一つである臨界期可塑性の詳細なメカニズムを解明し、脳が外界の環境に適応し学習能力を発揮できるようになる過程を明らかにするものである。臨界期可塑性の研究は、神経科学の重要なテーマであり、その重要性は増大している。成熟動物でも可塑性を復活させる試みが世界中で行われており、そのためには大脳皮質の可塑性メカニズムを理解し、臨界期可塑性を回復することが重要である。この研究は、発達障害や神経疾患の治療法開発に新たな道を開く可能性を持ち、脳の発達や学習支援にも新しいアプローチを提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Columnar structures are considered the fundamental units of the cerebral cortex and form the basis for information processing in higher animals. Shortly after the formation of thalamocortical projections, cannabinoid receptors (CB1R) begin to function on layer 4 (L4) axon terminals, coinciding with the timing of columnar formation of L4 axons. In mice genetically deficient in diacylglycerol lipase alpha, the key enzyme for 2-AG synthesis, the columnar structure of L4 axons was disrupted. Intraperitoneal administration of a CB1R agonist resulted in shorter axon length, and knockout of CB1R in L4 neurons impaired the columnar projections of axons.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 臨界期 STDP

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質には、特定の機能を持つニューロンが垂直方向に並んでいる構造、円柱構造(カラム)が存在する。一つ一つの円柱は脳の中にある小さな「機能ユニット」のようなものであり、各ユニットは特定の種類の情報を処理する役割を持っている。このカラムは、皮質に地図のように整然と配置され、カラム内のニューロンの軸索は、垂直方向に投射している。このような構造は高等動物の新皮質全体に見られ、新皮質の高次機能に極めて重要であると考えられている。しかし、これらの精密な投射が発生過程でどのように形成されるのかについての根本的なメカニズムは、まだ十分に研究されていない。

これまでの研究では、ニューロンの軸索が特定のニューロンに向かって伸びてシナプス結合を形成することで、カラム状の軸索投射が達成され、セロトニンがこの過程に関与していることが示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムは未解明である。我々は以前、スパイクタイミング依存性可塑性(STDP)がシナプス結合の強化と弱化を通じて、神経回路の形成と軸索の成長に重要な役割を果たすことを示した。特に、視床ニューロンの皮質第4層への投射(視床皮質軸索)におけるエンドカンナビノイド依存的な長期抑圧(LTD)は、1型カンナビノイド受容体(CB1R)のノックアウトマウス(KO)において阻害されることから、視床皮質軸索の特定のターゲティングに重要であることが示された。

2. 研究の目的

これまでの研究で、CB1Rが神経回路形成(退縮)と大脳皮質の可塑的な時期(臨界期)開始に重要な役割を果たすことが示されている。そのリガンドである内因性カンナビノイド(eCB)は、アナンダマイドと2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)の2つが候補とされているが、まだ特定されていない。本研究の目的は、この**内因性カンナビノイドを特定すること**である。

視床皮質軸索投射は、生後直後に2/3層まで過形成した後、軸索終末にCB1Rが発現し、LTD-STDPによって第4層まで退縮し収まることが示されている。また、生後12~15日以降、第4層ニューロンから第2/3層(L2/3)への軸索投射終末にCB1Rが発現し、LTD-STDPによって隣接カラムとの不要なシナプス結合が刈り込まれることが知られている。これらの観点から、**CB1R依存性に隣接カラムへの軸索がLTD-STDPによって刈り込まれ、円柱状の軸索投射が形成されると**推測される。本研究の第2の目的は、この仮説を検証することである。

3. 研究の方法

内因性カンナビノイド(eCB)の同定

2-AGの合成酵素であるジアシルグリセロールリパーゼアルファ(DGL)を欠損する動物(DGL-KO)を用いて、2-AGがeCBである可能性を検証する。

- i) 視床-L2/3のLTD-STDPの誘導は阻害されるか(生後2週目)?
- ii) L4-L2/3のLTD-STDPは誘導できるか(生後3週目)?
- iii) 視床皮質投射に異常はあるか(パレル特異的投射は保たれるか)?

これらを検証するため、生後12日目(P12)のマウスから視床皮質スライスを作製し、視床にDiIのクリスタルを埋め込む。スライスをPFAで固定し、遮光して4-8週間インキュベートする。その後、DiI標識された軸索終末の皮質内での広がりを共焦点顕微鏡で観察する。

4層細胞軸索投射形成とCB1Rの関与

生後12日以降、4層細胞の軸索終末にCB1Rが発現し、次第に円柱状投射が形成される。ここでは、4層細胞の軸索投射形成とカラム構造形成に、視床皮質投射形成と同様にCB1Rによる軸索刈り込みのメカニズムが働く可能性を探索する。

- i) CB1Rの作動薬、拮抗薬による投射の変化 生後12日以降、1日おきにCBの作動薬(WIN)または拮抗薬(AM281)を腹腔内投与する。生後20-23日目に視床皮質スライスを作製し、4層のスパイニーステラート細胞からホールセル記録を行う。電極内にはNeurobiotin(0.7%)を封入し、記録後にスライスをPFAで固定、streptavidin-fluoresceinで蛍光ラベルし、共焦点顕微鏡で観察する。投薬による軸索投射の広がりやブランチ数への影響を検討する。
- ii) DGL-KOマウスの4層細胞軸索 DGL-KOマウスを用いて、L4-L2/3シナプスにおける2-AGの役割を調査する。生後20-23日のDGL-KOマウスから視床皮質スライスを作製し、ホールセル記録によってNeurobiotinを注入し、4層細胞の形態を観察して投射の異常を検討する。
- iii) CB1R-KOマウスによる4層細胞CB1R強制発現によるレスキュー実験 胎生日(E13.5)のCB1R^{f1/f1}マウスにpCAG-CreベクターとAAV-pCAG-FLEX-EGFP-WPRを子宮内エレクトロポレーション法で導入し、遺伝子発現をスパースに調整する。深麻酔後、電気パルス(40V、50ms、950ms間隔で5回)を鉗子型電極を用いてエレクトロポレーター(CUY21, Nepa Gene)

で行う。プラスミドは水 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) に溶解する。

4. 研究成果

DGL 欠損マウスにおける L4 軸索の発達の变化

DGL 欠損マウスの L4 軸索の発達变化を調べ、CB1R が L4 軸索のカラム状投射の調整に関与しているかどうかを検証した。結果は以下の通りである。

- i) 野生型マウスの発達初期 (P7-P8) では、L4 軸索は主に下層 (L4-L6) に位置し、上層 (L1-L3) にはわずかな軸索しか存在しなかった。その後、軸索は上層へと伸び (P10~)、カラムを無視した軸索投射となり、最終的にカラム状投射が形成された (~P23)。
- ii) DGL 欠損マウス (P23) では、多くの軸索が隣接するカラムにまで伸びていた (図 1)。これらの結果から、DGL が欠損すると L4 軸索の投射パターンに異常が生じ、CB1R が L4 軸索の正確なカラム状投射に重要な役割を果たしていることが示唆された。

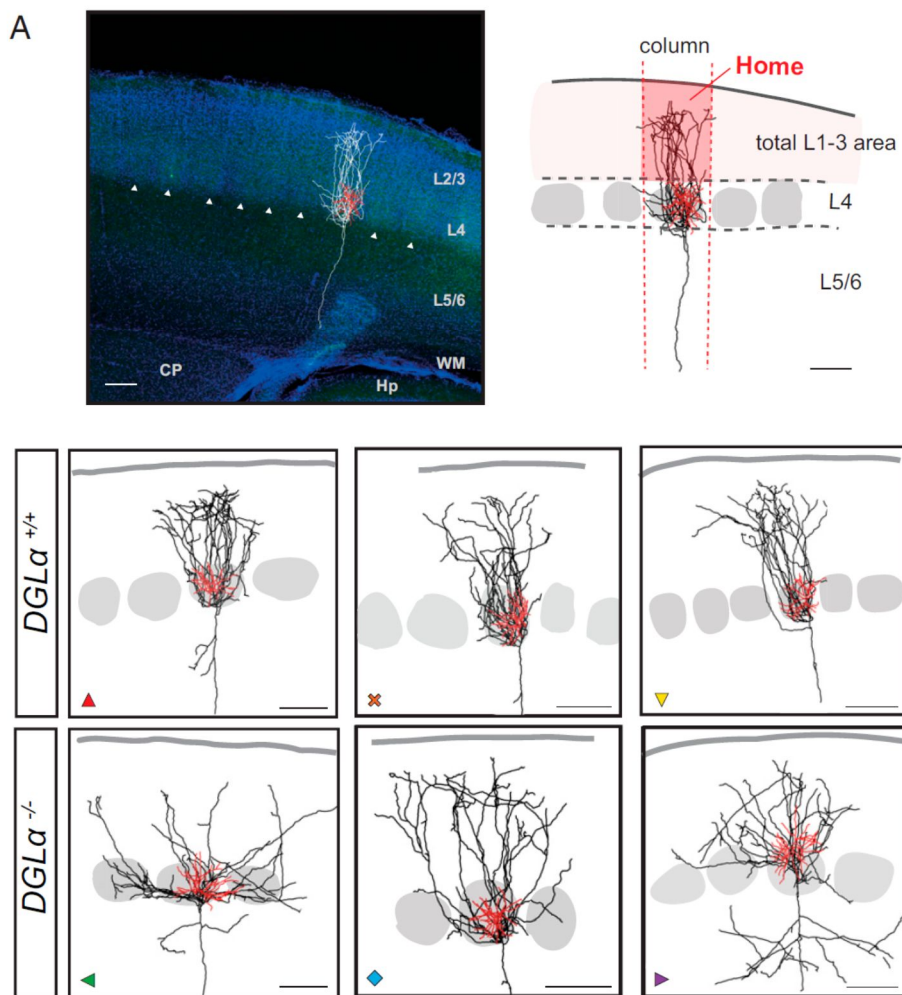


図 1. 成熟 (P19-P23) DGL 欠損マウスにおける L4 有棘星状細胞の軸索の柱状投射の障害
L4 有棘星状体軸索の共焦点像 (左) と、そのトレース (層と平行カラムを示す) (右)。
(下) L4 軸索 (黒) と樹状突起 (赤) のトレース例。 (形態写真と図のスケールバーは 200 μm 。)

内因性カンナビノイドの特定

2-AG の合成酵素である DGL を欠損するマウスを用いて、視床-L2/3 の LTD-STDP 誘導が阻害されるかを調査した結果、2-AG が内因性カンナビノイドとして機能していることが強く示唆された。また、L4-L2/3 の LTD-STDP 誘導が可能であることから、2-AG が特に視床-L2/3 経路において重要であることが示された。

CB1R 作動薬および拮抗薬の影響

P12 以降、CB1R 作動薬 (WIN) または拮抗薬 (AM281) の投与によって、4 層細胞の軸索投射に変化が見られた。共焦点顕微鏡で観察した結果、作動薬投与による軸索の広がりが増加し、拮抗薬投与による軸索の広がりが減少した。これにより、CB1R が軸索の成長と投射に重要な調整役を

果たしていることが確認された。

DGLa-KO マウスの 4 層細胞軸索

DGLa-KO マウスを用いた予備実験では、L4-L2/3 シナプスにおいて 2-AG が eCB として機能している可能性が示された。ホールセル記録と Neurobiotin 注入による観察結果から、DGL 欠損による軸索の異常が確認された。

CB1R-KO マウスによるレスキュー実験

CB1R-KO マウスにおいて、4 層細胞に CB1R を強制発現させることで、軸索の正常な柱状投射が部分的に回復した。これにより、CB1R が軸索の正確な投射パターンの形成に必要であることがさらに支持された。

これらの成果から、CB1R と内因性カンナビノイドが脳皮質の柱状投射の形成において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itami Chiaki, Uesaka Naofumi, Huang Jui-Yen, Lu Hui-Chen, Sakimura Kenji, Kano Masanobu, Kimura Fumitaka	4. 巻 119
2. 論文標題 Endocannabinoid-dependent formation of columnar axonal projection in the mouse cerebral cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS	6. 最初と最後の頁 e2122700119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2122700119	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Itami C, Uesaka N, Huang JY, Lu HC, Sakimura K, Kano M, Kimura F
2. 発表標題 Endocannabinoid-dependent formation of columnar axonal projection in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 Neuroscience 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Naofumi Uesaka, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Endocannabinoid-dependent formation of columnar axonal projection in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------