

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689015

研究課題名(和文) 神経およびグリア細胞におけるイノシトール三リン酸を介したシナプス維持機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of synaptic maintenance mechanisms via inositol trisphosphate signaling in neurons and glial cells

研究代表者

大久保 洋平 (Okubo, Yohei)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40422282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：成体の脳が安定して機能するには、シナプスの機能が維持される必要がある。そして「勘が鈍る」という、適切な入力遮断による脳機能低下を示唆する概念が存在する。申請者は、この概念を「脳における持続的経験入力依存性シナプス維持機構」という、実験的に検証可能な課題に翻訳し研究に着手した。

成熟マウスのヒゲを切除することにより、大脳皮質においてシナプス強度が低下することを確認した。これには、神経細胞における代謝型グルタミン酸受容体およびイノシトール三リン酸(IP3)シグナリングの遮断が関与していた。以上より持続的ヒゲ入力により惹起されるIP3シグナリングがシナプス維持に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Synaptic functions should be maintained for the stable information processing in the brain. It is recognized that the shut down of experience inputs result in the attenuation of corresponding brain functions. We thus set out to investigate mechanisms underlying the synaptic maintenance mediated by ongoing experience-dependent inputs.

Whisker deprivation in mature mice induced the attenuation of synaptic strength in the neocortex. We revealed that the shut down of metabotropic glutamate receptor and following inositol trisphosphate (IP3) signaling in neurons is involved in this deprivation-induced attenuation. Therefore, IP3 signaling induced by ongoing whisker inputs is indispensable for the maintenance of synaptic functions.

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：脳・神経 イノシトール三リン酸 カルシウム mGluR アストロサイト シナプス

### 1. 研究開始当初の背景

成体の脳神経回路が生涯にわたって安定して機能し続けるには、神経回路の根幹であるシナプスの機能が不用意に変化せず維持される必要がある。ヒトにおいては、健全な脳はおよそ 100 年にも渡りその機能を維持し続け、驚くべき長期安定性を示す。しかしシナプスはシナプス可塑性によりダイナミックな変化を示すことが知られている。増強と抑圧の動的バランスだけでは、シナプス機能を維持するにはあまりに不安定であり、**シナプス維持を特異的に担う分子機構の存在**が期待される。しかしながら、十分な知見は得られていなかった。シナプス維持機構を解明することで、脳機能低下を抑制する方策について有用な知見を得ることが期待できた。

### 2. 研究の目的

シナプス維持機構の破綻は、脳機能の低下に繋がると考えられる。これに関連して、古来より「勘が鈍る」という概念、経験則が存在する。つまり、適切な入力の中断により、脳機能の低下が起こることが示唆されてきた。申請者らは、以上の概念を**脳における持続的経験入力依存的なシナプス維持機構**という、実験的に検証可能な課題に翻訳することで研究に着手した。代表的なスモールシナプスである小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスには代謝型グルタミン酸受容体 mGluR が存在する。mGluR は G-タンパク質を介して  $IP_3$  産生と共役しており、 $IP_3$  受容体を通じた小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出を惹起する。体性感覚入力に伴い、平行線維が mGluR の活性化に有利な連発発火を示すことが報告されていた。そこで申請者らは、mGluR が末梢からの入力を選択的に検出し、経験依存的なシナプス維持を担うという作業仮説を立て、その検証を試みた。

成熟動物の小脳における平行線維発火の慢性的阻害、mGluR アンタゴニストの慢性投与、 $IP_3$  分解酵素  $IP_3$ -5-ホスファターゼ (5ppase) を用いた  $IP_3$  濃度上昇の選択的慢性阻害により、平行線維からの伝達物質放出確率が低下することを見出した。また逆に、mGluR アゴニストの慢性投与により放出確率が上昇した。後シナプス側での mGluR- $IP_3$  シグナリングの阻害が、前シナプス放出確率の低下を惹起したが、この逆行性のシグナルは、神経栄養因子である BDNF が担っていることも発見した。以上は従来発見されていたシナプス可塑性とは全く異なる機構であり、シナプス維持を特異的に担うものである。

シナプス機能には神経細胞だけでなく、グリア細胞の一種であるアストロサイトも重要な寄与を果たしている。アストロサイトはシナプスを取り巻くように突起を伸ばし、グルタミン酸トランスポーターを介してシナプス間隙からのグルタミン酸の除去

を行うことで、正常なシナプス伝達を担っている。申請者らは、典型的なアストロサイトである小脳バークマングリアにおいて、 $IP_3$  産生に共役する ATP 受容体 (P2YR) のアンタゴニストの慢性投与および 5ppase 発現により、平行線維シナプスにおいてグルタミン酸の除去が遅れることを明らかにした。さらに P2YR- $IP_3$  シグナリングの阻害が、グルタミン酸トランスポーターである GLAST の発現を選択的に低下させることを見出した。

以上の研究により、**神経細胞においてはグルタミン酸-mGluR- $IP_3$ -BDNF-前シナプス放出確率、アストロサイトにおいては ATP-P2YR- $IP_3$ -GLAST-グルタミン酸取り込み能**という、興奮性シナプスの維持に必要な機構が、小脳において明らかになった。本研究では以上の成果をもとに、感覚入力と領野の対応が明確である大脳皮質に対象を移し、**感覚入力の遮断と増強がシナプス維持に及ぼす影響とその機構**を神経細胞およびアストロサイトの両面から明らかにする。

### 3. 研究の方法

神経回路形成が完了した成熟マウスに下記に示す処置を行った後、大脳皮質急性スライスを作成する。皮質カラム内の代表的投射である第 4 層-第 2/3 層投射を主な対象として解析を行う。放出確率については、第 2/3 層錐体細胞にパッチクランプ法を適用し、第 4 層刺激時の興奮性後シナプス電流 (EPSC) における Paired Pulse Ratio や使用依存性 NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 の結合速度により解析する。アストロサイト機能については、EPSC のタイムコースを解析するとともに、アストロサイトにおけるトランスポーター電流の測定や、GLAST の免疫組織化学的解析などにより検証する。

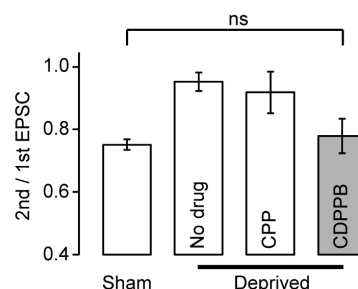
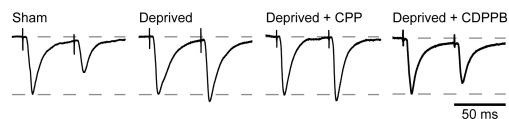
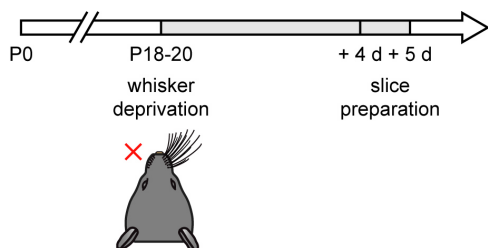
臨界期を過ぎた成熟マウスのヒゲを除去することにより、大脳パレル皮質の対応カラム内において、前シナプス放出確率が低下することが報告されている。そこでまず、この低下を確認し、それが mGluR の促進薬によって防ぐことが出来るかを検証する。そして mGluR アンタゴニストや 5ppase により、ヒゲ除去と同様の低下を再現できるかを検証する。またアデノウイルスベクターを用いて、大脳皮質アストロサイト特異的に 5ppase を発現させることに既に成功しており、これを用いてアストロサイト機能の検証を進める。

小脳平行線維シナプスにおいては、mGluR アゴニストの投与で放出確率が上昇した。感覚入力の増強により同様の現象が惹起されるかを検証するために、ヒゲにより多くの入力が入る enriched 環境でマウスを飼育し、その影響を調べる。さらに感覚入力増強の効果が、mGluR アンタゴニスト投与や 5ppase 発現により阻害されることも検証す

る。以上により、生理的な感覚入力 $IP_3$ シグナリングを介して、シナプス維持を担うことを示す。

#### 4. 研究成果

成熟マウスのヒゲを4~5日除去することにより、大脳パレル皮質における第4層-第2/3層シナプスの前シナプス放出確率が低下することを、Paired Pulse Ratio および使用依存性 MK-801 結合により確認した(図)。臨界期ではこのヒゲ除去依存性の放出確率の低下は、カナビノイド受容体 CB1 受容体とイオンチャネル型グルタミン酸受容体 NMDA 受容体に依存することが報告されている。しかし、我々が成熟マウスにおいて惹起した放出確率の低下は、これら受容体アンタゴニストによって阻害されなかった。よって成熟マウスでは臨界期とは別の機構が働いていることが示された。そこで実験計画に従い、mGluR のポジティブアロステリックモデュレーター(促進薬)である CDPBB を投与したところ、ヒゲ除去依存性の放出確率低下が阻害された(図)。そしてヒゲ除去をしていないマウスに対して、mGluR アンタゴニストを投与したところ、ヒゲ除去と同様の放出確率低下を再現した。さらに、第2/3層錐体細胞選択的に 5ppase を発現させることで、同様の放出確率低下を再現できた。つまり成熟マウスの大脳パレル皮質において、ヒゲ入力-第4層神経細胞からのグルタミン酸放出-第2/3層錐体細胞における mGluR- $IP_3$ シグナリング活性化-逆行性因子-前シナプス放出確率維持という機構が存在し、ヒゲ除去によりこの機構が破綻することが、シナプス機能の低下に繋がることが示された。この成果をまとめた論文は既に大部分の執筆が完了しており、投稿準備中である。



逆行性因子については、小脳と同様に BDNF の関与を期待しており、現在検証をすすめている。enriched 環境の影響は未だ解析中であり、今後の課題としたい。

アストロサイト機能については、5ppase を用いた解析を進めるなかで、外傷性脳障害における神経保護作用を発見し、論文として発表した。シナプス機能維持への関与は現在解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① 大久保 洋平, 代謝型グルタミン酸受容体シグナリングの可視化解析、日本薬理学雑誌、査読有、掲載確定
- ② Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Ming Xu, Kaname Satoh, Nami Kitajima, Keitaro Yoshida, Yohei Okubo, Takuya Sasaki, Satoru Moritoh, Hidetoshi Hasuwa, Masaru Miura, Kazuki Horikawa, Ko Matsui, Takeharu Nagai, Masamitsu Iino, Kenji F Tanaka, In vivo visualization of subtle, transient and local activity of astrocytes using an ultrasensitive  $Ca^{2+}$  indicator, Cell Rep, 査読有、掲載確定
- ③ Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Kuniaki Ishii, Masamichi Ohkura, Yohei Okubo, Masamitsu Iino, Imaging intraorganellar  $Ca^{2+}$  at subcellular resolution using CEPIA, Nat Commun, 査読有、掲載確定
- ④ 大久保 洋平, グルタミン酸スピルオーバーの可視化解析、日本薬理学雑誌、査読有、142 巻、2013、178-183  
DOI: 10.1254/fpj.142.178

⑤Kazunori Kanemaru, Jun Kubota, Hiroshi Sekiya, Kenzo Hirose, Yohei Okubo, Masamitsu Iino, Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury, Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 110 巻, 2013, 11612-11617  
DOI: 10.1073/pnas.1300378110

⑥大久保 洋平、グルタミン酸による非シナプス性伝達の可視化解析、BRAIN and NERVE-神経研究の進歩、査読無、65 巻、2013、651-658  
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=35186>

⑦Yohei Okubo, Imaging of Ca<sup>2+</sup> and related signaling molecules and investigation of their functions in the brain, Antioxid Redox Signal, 査読有, 14 巻, 2011, 1303-1314  
DOI: 10.1089/ars.2010.3367

[学会発表] (計9件)

①大久保 洋平、鈴木 純二、金丸 和典、飯野 正光、プルキンエ細胞における活動依存的な小胞体内腔 Ca<sup>2+</sup>動態の可視化解析、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、東北大学川内萩ホール、仙台国際センター (宮城県)

②大久保 洋平、代謝型グルタミン酸受容体シグナリングの可視化解析、第 87 回日本薬理学会年会 (招待講演)、2014 年 3 月 20 日、東北大学川内萩ホール、仙台国際センター (宮城県)

③大久保 洋平、鈴木 純二、金丸 和典、飯野 正光、プルキンエ細胞における活動依存的な小胞体内腔 Ca<sup>2+</sup>動態の可視化解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 21 日、国立京都国際会館 (京都府)

④大久保 洋平、飯野 正光、神経-グリア-血管連関を担うグルタミン酸スピルオーバー動態、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡県)

⑤大久保 洋平、飯野 正光、脳血流制御のトリガーとしてのグルタミン酸スピルオーバー動態、第 22 回日本循環薬理学会、2012 年 11 月 30 日、富山国際会議場 (富山県)

⑥大久保 洋平、飯野 正光、グルタミン酸スピルオーバーの時空間動態、第 89 回日本生理学会大会 (招待講演)、2012 年 3 月 31 日、信州大学松本キャンパス (長野県)

⑦大久保 洋平、間下 雅士、山澤 徳志子、山崎 美和子、渡辺 雅彦、村山 俊彦、飯野 正光、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸シグナリングは小脳バグマングリアのグルタミン酸取り込み活性を維持する、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館 (京都府)

⑧大久保 洋平、間下 雅士、山澤 徳志子、山崎 美和子、渡辺 雅彦、村山 俊彦、飯野 正光、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸シグナリングは小脳バグマングリアのグルタミン酸取り込み活性を維持する、第 125 回日本薬理学会関東部会、2011 年 10 月 15 日、日本大学薬学部 (千葉県)

⑨大久保 洋平、間下 雅士、山澤 徳志子、山崎 美和子、渡辺 雅彦、村山 俊彦、飯野 正光、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸シグナリングはバグマングリアのグルタミン酸取り込み活性を維持する、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大久保 洋平 (OKUBO, Yohei)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 40422282