

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800001

研究課題名（和文）てんかん原性回路における内因性カンナビノイドシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Analysis for endocannabinoid signaling in the epileptogenic circuit

研究代表者

内ヶ島 基政 (UCHIGASHIMA MOTOKAZU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10614662

研究成果の概要（和文）：本研究は、免疫組織化学を中心とした分子形態学的手法を通じて、てんかん発症の原因と成りうる歯状回苔状細胞-顆粒細胞シナプスが内因性カンナビノイド 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) を介したシナプス伝達抑制を受けやすくするための分子形態学的基盤を有することを明らかにした。この結果は 2-AG が苔状細胞-顆粒細胞シナプスの異常な興奮を抑える効果的なブレーカーの役としててんかん発症を防いでいることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：This research project revealed the molecular anatomical basis for a major endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), to effectively inhibit synaptic transmission at mossy cell-granule cell synapses, which constitute a potential epileptogenic circuit in the CNS. This suggests that 2-AG plays a role as a synaptic circuit breaker to prevent the epileptogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：医歯薬学・神経科学一般

キーワード：内因性カンナビノイド、カンナビノイド受容体 CB1、歯状回、てんかん

1. 研究開始当初の背景

内因性カンナビノイドは、ニューロン活動依存的にポストシナプス側から合成・放出され、プレシナプス側のカンナビノイド受容体 CB1 を介してシナプス伝達を抑制する。我々の研究グループは、この逆行性シナプス伝達抑制を担う内因性カンナビノイドがジアシルグリセロールリパーゼ α (DGL α) によって産生される 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) と呼ばれる脂質であることを示し、

中枢神経系の様々なシナプスにおいて備わる神経伝達調節機構であることを明らかにしてきた (Kano et al., *Physiol Rev.*, 2009)。

歯状回は側頭葉てんかんの代表的な焦点部位として知られる。歯状回には顆粒細胞と苔状細胞の 2 種類の興奮性ニューロンが存在し、互いに神経投射を行っている。この結果、両者の間に形成される神経回路が正の帰還回路となり、てんかん発症の一因となることが想定されている (Ratzliff et al., *Trends*

Neurosci., 2002)。

これまでに歯状回の興奮性シナプスにおいて CB1 が豊富な発現を示すことに加え、CB1 欠損マウスにおけるてんかん閾値の低下が報告されている (Monory et al., *Neuron*, 2006)。そこで本研究では、てんかんの原因ともなる正の帰還回路を構成する歯状回シナプスにおいて、2-AG が効果的にシナプス伝達を抑制し、異常な興奮性シナプス伝達を抑制するための分子機構が備わっているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、歯状回において正の帰還回路を構成する苔状細胞-顆粒細胞シナプスおよび顆粒細胞-苔状細胞シナプスにおいて、2-AG の合成酵素、標的受容体、分解酵素の分子局在、さらには各シナプスの空間的分布を種々の形態学的手法により明らかにすることにより、てんかん原性回路シナプスにおける 2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構の分子形態学的基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)2-AG シグナル伝達関連分子の検出

2-AG の合成酵素、受容体、分解酵素である DGL α 、CB1、モノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) に対して、特異的に mRNA を認識するプローブあるいは特異的抗体を作製し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法、蛍光免疫染色法、免疫電子顕微鏡法を用いることで、成体マウス苔状細胞-顆粒細胞シナプスおよび顆粒細胞-苔状細胞シナプスにおけるそれぞれの分子の発現分布解析を行った。

(2)シナプス形態解析

連続電子顕微鏡切片を作製し、苔状細胞-顆粒細胞シナプスおよび顆粒細胞-苔状シナプスの断面を周囲の構造物の断面と共に取得し、専用ソフトを用いてそれぞれ立体再構築した。再構築像は使用してシナプス周囲の構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1)苔状細胞-顆粒細胞シナプスにおける 2-AG シグナル伝達機構

2-AG 合成酵素 DGL α はポストシナプスとなる顆粒細胞スパインの基部を中心に発現したのに対し、2-AG の受容体 CB1 はプレシナプスとなる苔状細胞終末およびその近傍軸索部に分布した。すなわち、苔状細胞-顆粒細胞シナプスに 2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制機構が備わっていることを示している。一方、2-AG 分解酵素 MGL は、苔状細胞-顆粒細胞シナプスに発現せず、その周囲のアストロサイトや抑制性終末のみで

発現し、それらは 2-AG の主要な放出部位と想定される顆粒細胞スパインを部分的にしか覆っていなかった。加えて、苔状細胞-顆粒細胞シナプスは空間的に高密度に存在し、互いに隣接しながら分布することも見出した。以上の結果から、苔状細胞-顆粒細胞シナプス周囲では 2-AG が空間的に拡散しやすい分子形態基盤が整っており、局所で産生された 2-AG が複数の苔状細胞-顆粒細胞シナプスの伝達を効率的に抑制することが示唆された。

(2)顆粒細胞-苔状細胞シナプスにおける 2-AG シグナル伝達機構

顆粒細胞-苔状細胞シナプスは、顆粒細胞の巨大な神経終末が苔状細胞の大型スパインをすっぽりと覆う特徴的な構造を示した。大型スパインでは、DGL α の限局した極めて強い発現が認められた。その一方、顆粒細胞終末は MGL の豊富な発現を示すものの、CB1 はほとんど検出されなかった。発達期においても検討を行ったが、CB1 は顆粒細胞終末において一貫して検出されなかった。すなわち顆粒細胞-苔状細胞シナプスは、苔状細胞スパインから放出された 2-AG がプレシナプスとなる顆粒細胞終末のみに到達し、隣接するシナプスへ拡散しにくい形態基盤を示すものの、顆粒細胞終末には CB1 を発現しないために、2-AG を介した逆行性シナプス伝達抑制を引き起こさないシナプスと考えられた。

以上の成果は、2-AG の合成・伝達・分解の各過程に寄与する分子の局在とそれらが配置されているシナプス構造を包括的に解析した世界で初めての報告であり、2-AG の伝達様式の理解に大きく貢献した。さらに本研究成果は 2-AG がてんかんに対して予防的に作用している可能性を示唆しており、DGL α -KO マウスを用いたてんかん研究が今後期待される。これらの点は国内外で高く評価され、*J Neurosci* 誌 (Uchigashima et al., 2011) に掲載された。

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 11 件)

- ① Kawakita I, Uchigashima M, Konno K, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M. Type 2 K⁺-Cl⁻ cotransporter is preferentially recruited to climbing fiber synapses during development and the stellate cell-targeting dendritic zone at adulthood in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci*. 査読有、37(4)、2013、532-43

- DOI:10.1111/ejn.12076.
- ② Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M. Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci*. 査読有、32(50)、2012、18035-46
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012.
- ③ Nishizawa K, Fukabori R, Okada K, Kai N, Uchigashima M, Watanabe M, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Kobayashi K. Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. *J Neurosci*. 査読有、32(39)、2012、13421-32
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1969-12.2012
- ④ Matsumoto H, Shibasaki K, Uchigashima M, Koizumi A, Kurachi M, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K, Watanabe M, Kishi S, Ishizaki Y. Localization of acetylcholine-related molecules in the retina: implication of the communication from photoreceptor to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 査読有、7(8)、2012、e42841.
DOI:10.1371/journal.pone.0042841
- ⑤ Tanimura A, Uchigashima M, Yamazaki M, Uesaka N, Mikuni T, Abe M, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有、109(30)、2012、12195-200.
DOI:10.1073/pnas.1204404109
- ⑥ Iwakura A, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M. Lack of molecular-anatomical evidence for GABAergic influence on axon initial segment of cerebellar Purkinje cells by the pinceau formation. *J Neurosci*. 査読有、32(27)、2012、9438-48.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1651-12.2012
- ⑦ Fukabori R, Okada K, Nishizawa K, Kai N, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Tsutsui Y, Kobayashi K. Striatal direct pathway modulates response time in execution of visual discrimination. *Eur J Neurosci*. 査読有、35(5)、2012、784-97.
DOI:10.1111/j.1460-9568.2012.08005.x
- ⑧ Yaguchi H, Okumura F, Takahashi H, Kano T, Kameda H, Uchigashima M, Tanaka S, Watanabe M, Sasaki H, Hatakeyama S. TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J Biol Chem*. 査読有、287(15)、2012、12050-9.
DOI:10.1074/jbc.M111.307678
- ⑨ Chiodi V, Uchigashima M, Beggiato S, Ferrante A, Armida M, Martire A, Potenza RL, Ferraro L, Tanganelli S, Watanabe M, Domenici MR, Popoli P. Unbalance of CB1 receptors expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 査読有、45(3)、2012、983-91.
DOI:10.1016/j.nbd.2011.12.017
- ⑩ Kato S, Kuramochi M, Kobayashi K, Fukabori R, Okada K, Uchigashima M, Watanabe M, Tsutsui Y, Kobayashi K. Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J Neurosci*. 査読有、31(47)、2011、17169-79.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4005-11.2011
- ⑪ Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M. Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 査読有、31(21)、2011、7700-14
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5665-10.2011
- [学会発表] (計7件)
- ① 内ヶ島基政、黒質線条体ドーパミンシナプスは GABA 作動性シナプスの分子機構を利用した係留性接着装置である、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月28日～2013年3月30日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)
- ② 内ヶ島基政、ドーパミンは背外側線条体においてシナプス伝達とボリューム伝達の間際の伝達様式を示す、第58回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2012年9月22日～2012年9月23日、山形大学(山形市)
- ③ 内ヶ島基政、The mode of nigrostriatal dopaminergic transmission is intermediate between wired and volume transmission. 第58回日本神経科学大会(NEUROSCIENCE 2012)、2012年9月18日～2012年9月21日、名古屋国際会議場(愛知県)
- ④ 内ヶ島基政、黒質線条体系ドーパミン投射

における伝達様式の再検討、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 3 月 26-28 日、山梨大学（甲府市）

- ⑤ 内ヶ島基政、Immunohistochemical characterization of dopaminergic synapses in the mouse striatum. 第 35 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑥ 内ヶ島基政、ボリューム伝達様式を介した線条体におけるドーパミン神経伝達、第 57 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2011 年 9 月 10-11 日、岩手大学（盛岡市）
- ⑦ 内ヶ島基政、Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. 8th IBRO World Congress of Neuroscience、2011 年 7 月 14-18 日、フィレンツェ（イタリア）、the Fortezza da Basso

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内ヶ島 基政 (UCHIGASHIMA MOTOKAZU)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10614662