

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430022

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

研究課題名(英文) Roles of cannabinoid-dependent plasticity in the developing neuronal circuit in the mouse barrel cortex

研究代表者

伊丹 千晶 (Chiaki, Itami)

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CB(カンナビノイド)は従来、その精神的作用にのみ注目されてきたが、バ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、生後7-12日(P7-12)において、視床 2/3層にはLTDだけのSTDPがある事を見出し、このSTDP-LTDは、CB依存性であることを示した。同時に、カンナビノイド受容体欠損マウスでは、STDP-LTDが消失していること、VBの軸索投射に異常があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Activation of cannabinoid CB1 receptors (CB1Rs) causes both physiological and morphological effects on the development of neuronal circuits. In the rodent barrel cortex, CB1R is required for the long-term depression (LTD) component of spike timing-dependent plasticity (STDP). We showed that CB1R activation caused LTD in a spike timing-dependent manner (t-LTD) at thalamocortical terminals. Since CB1R knockout (KO) mice showed disrupted thalamocortical projection, we concluded that endogenous CB1R signalling is important in translating physiological changes into morphological consequences.

研究分野：神経科学

キーワード：体性感覚野 スパイクタイミング可塑性8(STDP) カンナビノイド

1. 研究開始当初の背景

神経活動が、回路形成に重要な役割を果たす事は以前から知られていたが、具体的にどのような活動が回路の精緻化に関わっているのかについては殆ど分かっていない。視床皮質投射は以前からそのモデルとして調べられてきた。出生時 (P0) 視床投射は皮質板に到達し、皮質板内でシナプス形成を行う。P3-4には皮質板から4層、2/3層が分化し、視床線維の一部はP4までの間に皮質表面に達するものがあるものの、2/3層内への投射は退縮をしていき、究極的には視床終末はほぼ4層内にとどまる。P6-7以降、今度は4層細胞は2/3層への投射形成を始める。我々はかつて、4層-2/3層投射においては、シナプス形成時には、長期増強(LTP)だけのスパイクタイミング依存性可塑(LTP-STDP, t-LTP)を示すが、P13-15以降に4層細胞終末にカンナビノイド受容体(CB1R)を獲得することによって、長期抑圧(LTD)を伴った、LTP-LTD型のSTDPにスイッチすることを示した(Itami et al. J. Neurosci., 2012)。このスイッチは受容野可塑性の開始と深い関わりがあるが、同時にこの時4層-2/3層投射の精緻化が起こることも知られており、STDPという神経活動に伴う生理的变化とシナプス形成が深く関わり合うこと、また、CB1RとSTDP、さらに投射の精緻化に重要な関連があることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、視床皮質投射において、投射形成時にt-LTPが、また過剰投射された視床-2/3層シナプスではt-LTDが働く可能性を検討する。また、CB1Rが視床皮質投射の退縮に関与している可能性を検討する。CB1Rの活性化が軸索投射の刈り込みを惹起するとすると、カンナビノイドの新たな作用として重要である。本研究はこの点も検証し、生理学的可塑性と形態的可塑性をリンクするメカニズムとしてのCB1Rの作用を調べる。

3. 研究の方法

(1) 視床皮質スライスを用いた電気生理実験

(1)-1 STDP 曲線の作成

生後2週(生後7-14日)のマウスから視床とその投射先である大脳皮質への線維連絡を保持した切片標本を作製する。視床に刺激電極を静置し、バレル皮質2/3層の錐体細胞からガラス管電極を用いてホールセル記録を行い、細胞内電位を記録し、視床刺激による興奮性シナプス電位(EPSP)を記録する。ここで、視床刺激によるEPSPと、電流注入による活動電位発生の時間について、ある一定の時間差を設定し、その条件で90回のペアリング刺激を7秒間隔で行い(タイミング刺激)、その後EPSPの変化を観察

する。タイミング刺激に用いる時間差を±200ms以内で様々な値に設定し、それぞれの条件かで得られたLTP, LTDを用いてSTDP曲線を作成する。

(1)-2 カンナビノイドの感受性テスト

視床-2/3層投射における、カンナビノイドアゴニスト、あるいはアンタゴニストに対する感受性をテストする。

(2) 免疫組織化学によるCB1Rの局在

CB1R, VGluT1, VGluT2の抗体を用いて3重染色を行い、視床終末にCB1Rが局在するかどうかを検討する。

(3) 視床-皮質投射の形態学的解析

(3)-1 CB1R作動薬、拮抗薬投与の効果の検討
視床-皮質投射が生後2週目に、特に2/3層、4層において形態学的に投射が変化するかどうかを検討する。実験は、視床細胞にのみGFPを発現した遺伝子改変マウスを用いる。また、VGluT2染色により、視床皮質終末を可視化した方法も併用する。

(3)-2 内因性カンナビノイドの作用の検討

視床皮質スライスを作製し、視床にDiIを注射針で注入する。ホルマリン固定後、コンフォーカル顕微鏡で、各視床線維を描写する。CB1R-KO、野生型での結果を比較し、内因性カンナビノイドの作用を検討する。

4. 研究成果

視床-皮質投射は、生直後から強力なt-LTPを示すが、2/3層、4層への分化と同時に、2/3層へはt-LTDスイッチし、4層へはSTDPを失うことがわかった。視床皮質投射のt-LTPはNMDA受容体を介し、PKA依存性であった。一方、t-LTDはCB1Rを介するが、これは視床皮質終末上に局在するものと推定された。さらに、CB1R作動薬(THCを含む)の外來性に投与すると、視床皮質投射の退縮を起こした。以上より、内因性のカンナビノイドが活動依存的に視床皮質投射を制御していることが推察された。CB1R-KOの視床皮質投射を調べると、確かに2/3層に過分の投射が認められた。加えて、バレル内への選択的投射にも大きな乱れを観察した。以上より、発達に伴うSTDPのスイッチと、これと同期して起こる、視床皮質投射終末でのCB1Rの獲得は視床皮質投射形成と、精緻化に重要な役割を果たしていることが強く示唆された(J. Neurosci., 36, 7039-7054, 2016)。

(1) 視床皮質投射 - STDPの発達に伴う変化と投射先依存性

視床-皮質スライス標本で、視床刺激によるEPSPを皮質2/3層、4層より記録し、スパイクタイミング刺激によるSTDPの誘導の発達に伴う変化を調べた。P4以前の2/3層、4層が未分

化の時期は皮質板より記録した。その結果、生直後では、プレーポスト、ポスト-プレー刺
激野いずれにもLTPを示す、LTPだけのSTDP
(t-LTP)を示した。このLTPはAP5、Rp-cAMP-S
によりブロックされることから、NMDA受容体、
PKAに依存することが分かった。また、その強
度はP4-5以降しだいに減弱化していき、皮質
板から2/3層が分化した後、視床-2/3層投射
はP7-8以降、t-LTDへとスイッチした。一方、
視床-4層投射はSTDPを失っていた。

(2) CB1Rの視床終末での局在とt-LTDの誘導
CB1Rのグローバルノックアウトと皮質興奮性
細胞特異的ノックアウトの2種類の遺伝子改
変動物から視床皮質スライスを作製して、
CB1R作動薬、WINの感受性を検討した結果、視
床皮質終末にCB1Rが局在することが分かった。
この点は、免疫組織化学実験からも裏付けら
れた。また、上記2種の遺伝子改変動物を用い
たt-LTD誘導実験からも、視床皮質投射の
t-LTDは視床終末に局在するCB1Rによるもの
である事を示した。

(3) 外来性に投与されたCB1R作動薬、拮抗
薬の効果

視床皮質終末に局在するCB1R受容体刺激によ
る退縮の可能性を調べるために、視床細胞に
GFP発現するROR-GFPマウスを用いて、CB1R作
動薬であるWIN及び9-THC、または拮抗薬で
あるAM281の腹腔内投与による効果を検討し
た。その結果、WIN,THCは共に視床皮質投射を
阻害すること、AM281投与では2/3層への過剰
投射が見られた。この結果は、VGluT2によ
って視床皮質終末を可視化した標本でも指示さ
れた。

(4) 内因性カンナビノイドによる視床皮質
投射制御

これまでの結果から、視床皮質投射は視床終
末に局在するCB1Rによって活動依存的に投射
が制御されていることが推察される。この点
を検討する目的でCB1R-KOを用いて視床皮質
投射の各線維を可視化して検討した。その結
果、CB1R-KOでは、P12において2/3層への過剰
な投射が確認できた。また、4層内でも、バレ
ルを無視したような投射が多く見られた。

以上より、CB1Rの発達に伴う発現は活動依
存的な視床皮質の投射制御に重要な役割を果
たしていることが明らかになった。また同時に、
CB1Rは生理的变化と形態的变化のいずれにも
関わっていることが明らかとなった。

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3件)

(1) Itami C, Kimura F. Concurrently
induced plasticity due to convergence of

distinct forms of spike timing-dependent
plasticity in the developing barrel cortex.
Eur J Neurosci., 査読有, 44, 2016,
2984-2990.

doi: 10.1111/ejn.13431.

(2) Itami C, Huang JY, Yamasaki M, Watanabe
M, Lu HC, Kimura F. Developmental Switch
in Spike Timing-Dependent Plasticity and
Cannabinoid-Dependent Reorganization of
the Thalamocortical Projection in the
Barrel Cortex. J Neurosci., 査読有, 36,
2016, 7039-54.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.4280-15.2016.

(3) Mizui T, Ishikawa Y, Kumano H, Lume
M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S,
Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki
K, Saarma M, Kojima M. BDNF pro-peptide
actions facilitate hippocampal LTD and are
altered by the common BDNF polymorphism
Val66Met. PNAS., 査読有, 112, 2015,
E3067-74.

doi: 10.1073/pnas.1422336112.

[学会発表](計7件)

(1) Itami, C., Physiological and
morphological roles of endocannabinoid
2-arachidonoylglycerol in the developing
neuronal circuit in the mouse barrel
cortex. 46th Annual Meeting of Society
for Neuroscience, 2016年11月12日~16
日 San Diego, 米国

(2) 伊丹 千晶、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、2016年7
月20日~22日、第39回日本神経科学大会、
パシフィコ横浜

(3) Kimura, F. Developmental Switch in
Spike Timing-Dependent Plasticity and
Cannabinoid-Dependent Reorganization of
the Thalamocortical Projection in the
Barrel Cortex. 10th FENS Forum of
Neuroscience, 2016年7月2日~6日,
Copenhagen, デンマーク

(4) 木村 文隆, バレル皮質2/3層カラム間水
平結合のスパイクタイミング依存性可塑性
(STDP)形成と4層-2/3層間STDPとの相互作
用、第120回 日本解剖学会総会・全国学術集
会・第92回 日本生理学会大会 合同大会、
2015年3月21日~23日、神戸

(5) Itami, C., Topographical precision in
the thalamocortical projection
mediated by cannabinoid receptor
in the developing barrel cortex, 44th
Annual Meeting of Society for Neuroscience,

2014年11月15日～19日, Washington, DC.,
米国

(6)木村 文隆, カンナビノイドを介したス
パイクタイミング依存性可塑性の相互作用
による投射制御, 第37回日本神経科学大会
2014年9月11日～13日, 横浜

(7)伊丹 千晶, 発達期バレル皮質における
カンナビノイド受容体を介した部位特異的
視床皮質投射第37回日本神経科学大 2014年
9月11日～13日, 横浜

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

木村 文隆 (Kimura, Fumitaka)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00202044

(4)研究協力者

Hui-chen LU
インディアナ大学・教授

J-Y HUANG
インディアナ大学・研究員