

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34451

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07057

研究課題名(和文)スパイクタイミング依存性可塑性が発達期神経回路形成に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Roles of spike timing-dependent plasticity in neural formation during development

研究代表者

木村 文隆 (Kimura, Fumitaka)

滋慶医療科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：00202044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の大脳新皮質は、進化的に最も新しく、最も高度な機能を果たしていると考えられている。機能的には、感覚情報処理を行う感覚皮質、運動指令を構成する運動皮質、感覚皮質、運動皮質の情報を統合する連合皮質と、大きく3つに分けられるが、構造的にはどの領域も同様の円柱状の構造を持ち、これが情報処理の単位となっていると考えられている。このように円柱構造は大脳皮質の基本単位と想定されているにもかかわらず、どのようなメカニズムでこの構造が出来ているかは全く分かっていない。本研究で、我々は、内因性のカンナビノイド(大麻の有効成分)が円柱構造形成に極めて重要な役割を果たす事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の共通構造である円柱状構造の形成メカニズムはこれまで殆ど全く分かっていなかった。これを始めて明らかにした事の意義は重大である。同時に、この円柱状構造の形成に大麻の有効成分であるカンナビノイドの受容体が関与していることの意味も極めて重大である。我々の結果は、成長期にカンナビノイドを摂取すると大脳皮質の円柱構造が正確に形成されないだけでなく、皮質4層細胞の軸索が刈り込まれてしまう可能性が極めて大きいことを示している。

研究成果の概要(英文)：The neocortex is highly evolved and thought to play the highest function in the mammalian brain, which includes sensory, motor and association cortex. Although these functions are extremely diverse, these cortices have an important morphological feature, that is columnar organization. In spite of its importance, how such columnar structure is made is mostly unknown. In the present study, we showed that endocannabinoid (cannabinoid is the active ingredient of marijuana) plays a key role in constructing this structure during development, by pruning the axons crossing the columns in an activity dependent manner, operating spike timing-dependent plasticity, or STDP.

研究分野：神経科学、神経生理学

キーワード：大脳皮質 円柱構造 カンナビノイド 4層細胞 活動依存的 発達期 臨界期

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は、感覚野、運動野、連合野と大きく3つの領野に別れ、極めて多様な機能を持ち、極めて高度な進化をとげた構造物と言っても過言ではないが、一方でそのような多彩な機能を担うにもかかわらず、どの皮質領域にも共通の構造的特徴も持っていることで知られる。そのような共通構造の1つが円柱状構造と呼ばれるもので、大脳皮質のどの領野もほぼ同一幅の円柱状にまとまった細胞の集合を1つの単位として、その中で一定の法則で投射する垂直投射と、円柱状構造(コラム構造)間を水平につなぐ水平投射で互いの連絡を取るという特徴を持つ。このうち、垂直投射というのは、各層の投射細胞が、自己の所属するコラム(自己コラム)の中だけで投射するというもので、例えば4層細胞は、その軸索を2/3層細胞に投射するのだが、殆どの軸索が自己コラム内の2/3層内に選択的に投射を伸ばし、隣のコラムには投射する軸索が格段に少ないというような投射様式を示す。この特徴は4層細胞だけでなく、2/3層、5層、6層細胞にも共通であり、投射先はそれぞれに異なるものの、同様の投射様式を示す。

このように、円柱状構造は、大脳皮質に広範に共通の基本構造であるが、どのようなメカニズムでこのような自己コラム内投射が形成されるのかについては、これまでに殆ど調べられておらず、関与する分子メカニズムなどについてもごく少数の報告を除いては皆無と言って良い状態であった。

一方、発達段階を見ると、4層-2/3層投射が始まる前に、視床-皮質(4層)投射が出来るが、視床皮質投射も、視床からのある領域からの細胞の軸索は皮質4層のある特定の領域内に投射することが知られている。最も顕著な例はげっ歯類の頬髭を受容野とする領域で、任意のヒゲからの投射は、視床内のその特定のヒゲに対応する領域(barreloid)から、皮質4層内のその特定のヒゲに対応する領域(barrel)に投射することが知られ、全てのヒゲがこのように視床、皮質内でそれぞれ特定の領域に投射している。我々は、視床皮質投射形成において、カンナビノイド(大麻の有効成分)受容体(CB1R)がこのような領域特異的投射の形成に重要な役割を果たしていることを示してきた。視床皮質投射は、発達初期では4層を越えて2/3層領域まで伸びているが、皮質内のこの特定のヒゲ対応領域細胞と視床内のヒゲ対応領域細胞との間で、スパイクタイミング依存性可塑性(spike timing-dependent plasticity, STDP)の中でも、CB1R依存性のスパイクタイミング依存性長期抑圧を起こし、4層を越えて2/3層まで伸びている異所性の投射が刈り込まれることによって、対応するヒゲ領域特異性の投射が出来ることを示した(Itami, 2016, J. Neurosci)。また、4層細胞は当初コラムを越えた投射線維が多くあるにもかかわらず、次第にコラム内に整理されていくが、この時期とほぼ同期して4層細胞の軸索終末でCB1Rが機能し始めることも示してきた(Itami, 2012, J. Neurosci)。

2. 研究の目的

上述の背景から、CB1Rが4層細胞の円柱状投射の形成に関与している可能性が考えられる。また、4層細胞と2/3層細胞間では、4層細胞が2/3層へ投射し始める頃から4層-2/3層順の発火では長期増強(LTP)を起こし、2/3層-4層順の発火では長期抑圧(LTD)を起こすが、このLTDはCB1Rを介している事も知られている。これらの知見を踏まえて、「4層細胞の円柱状投射の形成にはカンナビノイド及びSTDPが関与する」という仮説をたてた。本研究ではこの仮説を実験的に検証する。

3. 研究の方法

1) 内因性カンナビノイド欠損動物を用いた実験

円柱状投射形成にカンナビノイドが関与している可能性を検討する目的で、内因性カンナビノイドである2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)の合成酵素であるジアシルグリセロールリパーゼ α (DGL α)を遺伝的に欠損するマウスを用いた。このマウスにおいて、まず成熟動物の4層細胞の円柱状投射に異常がないかどうかを検討した。この目的で、このマウスのバレル領域から視床と皮質の線維連絡を維持したままで切片標本(視床-皮質切片標本)を作製し、4層細胞からパッチクランプ法を用いてホールセル記録を行って、電極内からニューロピオチンを注入した。生理実験終了後、切片標本をパラホルムアルデヒドで固定し、ニューロピオチンを蛍光発色させ、コンフォーカル顕微鏡で観察、画像取得を行い、ニューロルシダで解析する。

2) 発達に伴う4層細胞の軸索投射の検討

4層細胞の円柱状投射が発達に伴ってどのような経過を辿るかを調べた。この目的で、生後7-26日のマウスを用いて上述の1)の方法で4層細胞の軸索投射を検討した。また、このような発達経過をDGL α -KOでも行い、DGL α 遺伝子欠損の効果を比較検討した。

3) STDPの検討

4層-2/3層細胞間でSTDPが誘導できるかどうかを調べた。この目的で、上述1)の方法と同様に視床-皮質切片標本を作製し、4層電気刺激による興奮性シナプス後電位(EPSP)を2/3層錐体細胞からホールセル電極を用いて記録した。刺激電極と記録細胞間でシナプス後細胞-シナプス前細胞順の刺激を与え、LTDが誘導できるかどうかを検討した。この実験をDGL α -KO動物と野生型動物で行った。また、4層細胞と隣接カラム内2/3層細胞間でも同様の実験を行い、LTD誘発が可能かどうか検討した。

4) カンナビノイドアゴニストによる軸索刈り込みの検討

カンナビノイドアゴニストにより、4層細胞軸索に解剖学的変化があるかを検討した。この目的で、CB1Rアゴニストである Δ^9 -tetrahydrocannabinol(THC), 或いはWIN55, 212(WIN)を1日おきに腹腔内投与した(3mg/kg THC または 5mg/kg WIN)。実験は動物群を2群に分け、1群は生後1日(P1)-P12までアゴニストを投与し、P12-14に上述の1)の方法で切片標本を作製し、ニューロビオチンによる4層軸索像を観察した。他群はP13-P18にアゴニストを投与し、P18-P23に切片標本を作製し、ニューロビオチンによる4層軸索像を観察した。

5) CB1R-KO細胞による実験

4層細胞のCB1Rが軸索投射に関与しているかを検討する目的で、CB1R遺伝子を欠損した4層細胞を持つ動物を作製し、ニューロビオチンによる4層軸索像を観察した。この目的で、妊娠CB1R^{fl/fl}マウスを用いて、胎生13.5日にpCAG-CreベクターとAAV pCAG-FLEX-EGFP-WPREをelectroporation法により導入した。このようなマウスからP19-P23に視床皮質切片標本を作製し、4層のCB1R-KO細胞からと隣接する非KO細胞からホールセルパッチ電極を用いてニューロビオチンを導入し、4層細胞の軸索形態を検討した。

4. 研究成果

1) 内因性カンナビノイド欠損動物は4層細胞の軸索に円柱状投射の異常が見られた。

内因性カンナビノイド欠損動物において4層細胞の軸索投射のニューロビオチン像を検討したところ、WTで見られるような、自己カラム内投射を逸脱した細胞が有意に多く見られた。総軸索長を検討したところ、WTとKOで有意差は見られなかったものの(図1B左)、軸索の自己カラム内比率は、全層においても、また1-3層だけで比較してもKOでは有意に減少していた(図1B中央、右)。

2) 4層細胞軸索投射の発達に伴う変化

4層細胞軸索投射が発達に伴ってどのように変化するかをP7-P23において検討した。その結果、P7-P8では4層細胞の軸索は主に5/6層へ投射しており、2/3層への投射は僅かだった。その後、軸索は次第に上方へ伸びたが、細胞ごとに伸ばし方が異なり、P12頃までは円柱状の投射は見られない傾向があった。しかしこの後、次第に円柱状にまとまるようになり、P20頃には成熟動物で見られるような円柱状投射が完成していた。一方、DGL α -KOでは、P12まではWTと変わらないが、P12以降は大きく異なっており、円柱状投射を示さず、カラムを越えた投射が多くの細胞に残っていた。詳細に調べた結果、P12以前では、全軸索長、全層における自己カラム比率、1-3層での自己カラム比率には有意差が認められなかったものの(P値はそれぞれ0.5653, 0.3358, 0.3855, Wilcoxon test)、P13-P18では、全軸索長では

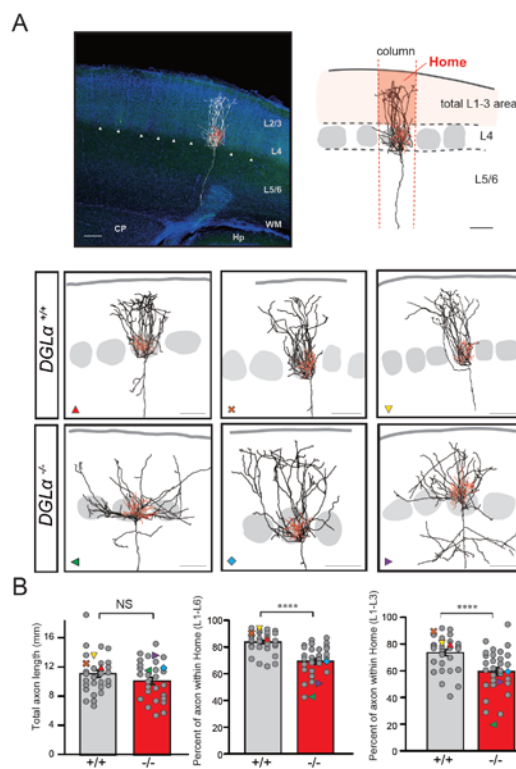


図1 DGL α -KOでは円柱状投射が崩壊し、自己カラムを越えた投射が多く見られる
A 代表例、B 全軸索長、全層、及び1-3層での自己カラム内比率の比較

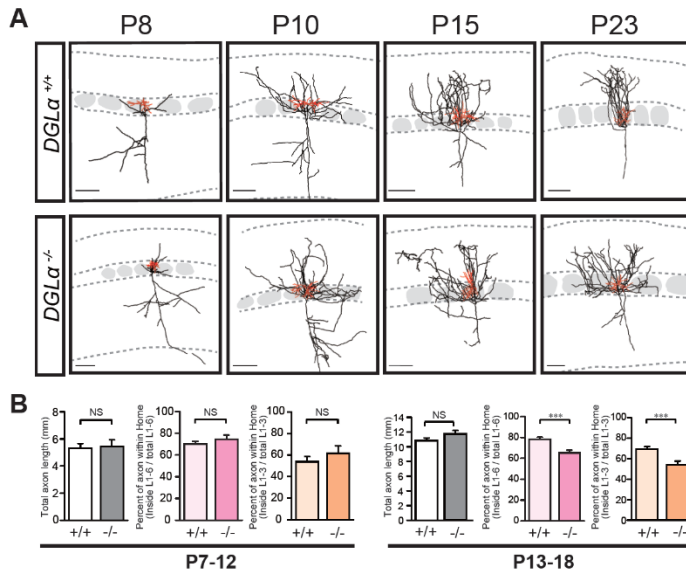


図2 4層細胞軸索投射の発達に伴う変化と DGLα 表現型の比較
 A 各日齢での代表例。B 各発達段階での全軸索長、全層、及び 1-3 層での自己カラム内比率の比較

両者に有意差はなかったが (P=0.1871)、全層、1-3 層内での自己カラム内比率には有意差が認められた (P 値はそれぞれ、0.008 と 0.0019、t-test) (図2)。

3) STDP の誘導

DGLα-KO において、4層-2/3層細胞間の逆タイミング刺激 (ポスト-プレ刺激) による、スパイクタイ

ミング依存性の長期抑圧 (LTD-STDP) の誘導に異常が見られるかを検討した。この STDP は生後 15 日以降に安定してみられるが (Itami, 2012, J. Neurosci)、P16-P20 の動物を使って、視床皮質切片標本を作製し検討してみたところ、STDP-LTD の誘導は有意に阻害されていた。次に 4層-隣接カラムの 2/3 層間で同様のテストを WT マウスを使って調べてみたところ、正常な LTD-STDP を誘発することが出来た。2/3 層細胞の発火は “同一カラム内の” 4 層の抑制性細胞によって、4 層-2/3 層細胞順の発火になるように制御されている (Kimura 2010, J. Physiol)。従って、4 層細胞と隣接 2/3 層細胞間では必ずしも 4 層-2/3 層順発火が保証されていないと考えられる。にもかかわらず、4 層-2/3 層細胞間で STDP-LTD が誘発可能であるとすると、両者間の発火タイミングが制御されていないために、自発発火でも LTD を誘発する傾向が高いことが示唆される。実際、CB1R 依存性の LTD-STDP はランダムな発火でも LTD を誘発することが出来る (Itami 2012, J. Neurosci)。これは、LTP 誘発のプレ、ポストの発火タイミングのウインドウ幅よりも LTD 誘発の発火タイミングウインドウ幅の方が数倍広いためであることが知られている (Itami, 2012, Feldman 2000)。

4) CB1R アゴニストの腹腔内投与により、P13 以降軸索刈り込みが場所非特異的に軸索全体で起こる

CB1R アゴニストにより、軸索の刈り込みがおこるのか、起こるとすればどの発達段階で起こるのか、またカラム内外での差はあるのかを検討する目的で、発達期の動物と使って 1 日おきにアゴニストを腹腔内投与し、直後に 4 層細胞の軸索像を検討した。その結果、P1-P12 にアゴニストを投与した動物では刈り込みは認められなかったが、P13-P18 投与群では THC, WIN 何れにおいても軸索長が短縮しており、刈り込みが起こったことが明らかとなった。しかしながら、この刈り込みはカラム内外とは関係なく場所非特異的であった。

5) CB1R を 4 層細胞特異的な遺伝子欠損を誘導した細胞ではカラム状投射が崩壊していた

4 層細胞特異的に CB1R 遺伝子欠損を起こした細胞で、カラム状投射が崩壊するかを検討したところ、遺伝子欠損を起こした細胞ではカラム状投射が崩壊していた。しかしながら、同一切片内の遺伝子欠損を起こしていない近接細胞では正常なカラム状投射をしていた。また、4 層細胞の軸索の水平方向の広がりを検討した。この目的で、細胞体から 20 μm ごとに区切られた脳表面に垂直なタイルを水平方向に作製し、その各タイル内での軸索長の合計を計算した。その結果、CB1R 遺伝子欠損細胞では WT に比べて有意に広範囲に広がっていることが分かった。

以上より、カラム状投射には内因性のカンナビノイドが重要な役割を果たしていることが結論づけることが出来た。生後 13 日以降、4 層細胞の神経終末には CB1R が発現するが、隣接カラムに伸びた軸索は隣接カラム内 2/3 層細胞との間で LTD-STDP を起こし、放出された内因性カンナビノイドが軸索の刈り込みを起こすことによって自己カラム内への選択的カラム状投射が出来上がる事を強く示唆していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Fumitaka Kimura, Chiaki Itami,	4. 巻 39
2. 論文標題 A hypothetical model concerning how spike-timing-dependent plasticity contributes to neural circuit formation and initiation of the critical period in barrel cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3784-3791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1684-18.2019	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Minoru Ohshima, Chiaki Itami, Fumitaka Kimura	4. 巻 595
2. 論文標題 The $\alpha 2A$ -adrenoceptor suppresses excitatory synaptic transmission to both excitatory and inhibitory neurons in layer 4 barrel cortex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physiology (London)	6. 最初と最後の頁 6923-6937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP275142	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fumitaka Kimura, Hiroshi Tamura
2. 発表標題 Developmental changes in spike sequence of L4, L2/3 neurons in response to whisker stimulations in the rat barrel cortex
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryutaro Ozaki, Fumitaka Kimura, Hiroshi Tamura
2. 発表標題 Spike activity of single neurons in sensory cortex are more related to population spiking activity of nearby neurons than to sensory stimulus
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 The endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol is required for neural circuit formation in the developing barrel cortex
3. 学会等名 FENS Forum 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumitaka Kimura, Minoru Ohshima, Chiaki, Itami
2. 発表標題 The $\alpha 2A$ adrenoceptor suppresses excitatory synaptic transmission to both excitatory and inhibitory neurons in layer 4 barrel cortex
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Jui-Yen Huang, Hui-Chen Lu, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Effects of exogenously administered cannabinoid on axonal projection of layer 4 neurons in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Society form Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Itami, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Fumitaka Kimura
2. 発表標題 Effects of cannabinoid agonists on axonal projection of layer 4 neurons in the developping mouse barrel cortex
3. 学会等名 第41回神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumitaka Kimura, Chiaki Itami, Kenji Sakimura, Masanobu Kano
2. 発表標題 Endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol plays important roles during neural circuit formation in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 第40回神経科学学会
4. 発表年 2017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 of layer 4 neurons in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
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
研究分担者	伊丹 千晶 (Itami Chiaki) (90392430)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	

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		
米国	Indiana University		