

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06523

研究課題名(和文) 内因性カンナビノイドによる脳発達の臨界期制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of the critical period by endocannabinoid

研究代表者

畠 義郎 (HATA, Yoshio)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40212146

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)：哺乳類視覚系の眼優位可塑性は大脳皮質の代表的な可塑性である。内因性カンナビノイドの合成酵素DGLの欠損動物では、眼優位可塑性の臨界期のタイミングが早くなっている。臨界期の開始には抑制性神経回路の成熟が関与することから、DGL欠損動物では抑制性神経回路の成熟が早い可能性を検討した。その結果、臨界期前のDGL欠損動物では抑制性シナプス伝達を表すmIPSCの頻度が増加していること、GABA受容体機能を薬理的に減弱すると眼優位可塑性が見られなくなることを見出した。以上より内因性カンナビノイド系は抑制性神経回路の成熟を介して臨界期のタイミング制御に関わると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳発達の臨界期の開始には大脳皮質の抑制性神経回路の成熟が関与することが知られているが、その制御メカニズムは不明な点が多い。今回、内因性カンナビノイド合成酵素の欠損が抑制性神経回路の早期成熟につながることを見出した。この成果は臨界期制御の理解を深めるとともに、シナプス伝達の調節因子として知られる内因性カンナビノイドの、抑制性神経回路の成熟を介して脳発達にかかわるといふ新しい役割を提示する。

研究成果の概要(英文)：Ocular dominance plasticity of the mammalian visual system is a representative plasticity of the cerebral cortex. In animals lacking the endogenous cannabinoid synthase DGL, the timing of the critical period of ocular dominance plasticity is accelerated. Since the maturation of inhibitory neuronal circuits is involved in the initiation of the critical period, we examined the possibility that the maturation of inhibitory neuronal circuits is earlier in DGL-deficient animals. We found that the frequency of mIPSCs, which represent inhibitory synaptic transmission, increased in DGL-deficient animals before the critical period, and that pharmacological suppression of GABA receptor function abolished ocular dominance plasticity. These results suggest that the endogenous cannabinoid system may be involved in the control of critical period timing through the maturation of inhibitory neural circuits.

研究分野：発達神経科学

キーワード：神経回路 視覚系 臨界期 内因性カンナビノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視覚系の可塑性と臨界期： 脳は出生後に外部環境に適応的に変化し、成熟する。大脳皮質一次視覚野の眼優位可塑性はその代表的なモデルである。これは生後初期の哺乳類の片方の眼を一時的に遮蔽すると、その眼への視覚野ニューロンの反応が減弱し、弱視になるという現象である。眼優位可塑性は臨界期と呼ばれる生後発達の一時期に強く発現し、成熟後は見られない。臨界期は視覚系だけでなく脳の様々な機能獲得について存在する。臨界期のタイミングがどのように決定されているかは、脳の成熟機構の理解に必須のポイントであり、現在精力的に研究がおこなわれている。その中で、抑制性神経回路の発達、とりわけ parvalbumin 発現細胞の成熟が臨界期の開始に重要であることが明らかとなった。しかしその成熟過程は BDNF、OTX2 など多くの分子の調節を受け、さらに抑制性ニューロンの他のサブタイプが眼優位可塑性に寄与するという議論もあり、臨界期のタイミング制御機構の全貌はまだ不明な点が多い。

臨界期と内因性カンナビノイド： 代表者は、内因性カンナビノイド系に注目して視覚野の発達メカニズムを研究してきた。カンナビノイドは大麻に含まれる成分であり、その作用機序の研究から、内因性カンナビノイドとして anandamide や 2-arachidonoylglycerol (2-AG) などが見出された。脳での主たる内因性カンナビノイドは 2-AG であり、その受容体 CB1, 2 や合成酵素 diacylglycerol lipase (DGL) α, β が同定されている。内因性カンナビノイドはシナプスで逆行性伝達物質として働き、伝達物質放出を抑制する。さらに長期増強/抑圧といったシナプス可塑性を媒介するなど、シナプス調節分子として知られている。

代表者はこれまでの研究で、内因性カンナビノイドの合成酵素 DGL α や受容体 CB1 が、眼優位可塑性が発現する臨界期直前から視覚野内で増加することを報告した (Yoneda et al. PLoS ONE 2013)。また DGL α 欠損動物を用いて、様々な生後齢で眼優位可塑性を調べたところ、DGL α 欠損動物では臨界期には眼優位可塑性が発現しないが、その直前の若い時期に発現することを見出した (亀山ら 日本神経科学大会 2016, 図 1)。この結果は、DGL α 欠損動物では臨界期が早まっていることを示唆し、内因性カンナビノイドが眼優位可塑性の臨界期のタイミング制御に関与する可能性を示している。

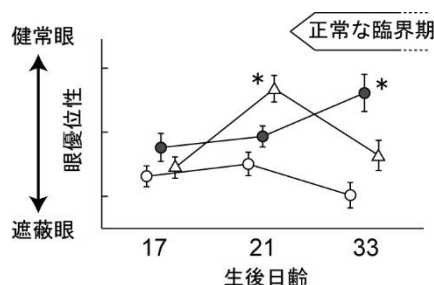


図 1. 片眼遮蔽を施した野生型動物 (●) では臨界期に眼優位性が健常眼側にシフトする。DGL α -KO (Δ) ではその直前の時期に眼優位性のシフトが見られる。* は片眼遮蔽をしない正常動物 (○) に比べて有意な変化を示す。

2. 研究の目的

では内因性カンナビノイドはいかにして臨界期のタイミングを制御するのか。前述のように臨界期の開始には抑制回路の発達が必要である。また内因性カンナビノイドは伝達物質の放出を抑制するが、視覚野では主に抑制性シナプスに CB1 受容体が分布する (Yoneda et al. PLoS ONE 2013)。これらから、DGL α 欠損動物では、内因性カンナビノイドによる抑制性シナプスでの放出抑制が起こらず、野生型よりも抑制機能が亢進し、抑制回路の発達が進んだ状態になり臨界期が早まった可能性がある。もちろん抑制回路を介さず未知の仕組みで臨界期に関わる可能性もある。このいずれの可能性が妥当かを検討するのが本研究の問いであり、脳発達の基本メカニズムの理解に重要なものである。

この問いに答えるため、本課題では DGL α 欠損動物において次の点を明らかにする実験を行

った。

- (1) 内因性カンナビノイド系を活性化することで臨界期の可塑性が再現するか
- (2) 視覚野の抑制性神経回路の発達に変化はあるか
- (3) 視覚野の抑制機能を操作することで臨界期タイミングを正常に戻せるか

3. 研究の方法

- (1) 内因性カンナビノイド系を活性化することで臨界期の可塑性が再現するか

眼優位可塑性が見られない臨界期 (P25) の DGLα 欠損動物に、内因性カンナビノイド作動薬である WIN55,212-2 を腹腔内投与するとともに片眼遮蔽を行った。7 日間の片眼遮蔽の後に一次視覚野より単一ニューロン活動を記録し、眼優位性を評価した。

- (2) 視覚野の抑制性神経回路の発達に変化はあるか

臨界期前 (P17) の DGLα 欠損動物と野生型動物の視覚野よりスライス標本を作成し、錐体細胞よりホールセル記録を行い、抑制性シナプス伝達の評価のため mIPSC の頻度と振幅を計測した。

- (3) 視覚野の抑制機能を操作することで臨界期タイミングを正常に戻せるか

DGLα の欠損が抑制機能を亢進して臨界期に影響するならば、抑制機能を減弱すればその効果を打ち消せるはずである。そこで P17 の DGLα 欠損動物にベンゾジアゼピン受容体の逆作動薬である DMCM を腹腔内投与して GABA 受容体機能を減弱するとともに片眼遮蔽を施した。4 日間の片眼遮蔽の後に一次視覚野より単一ニューロン活動を記録し、眼優位性を評価した。

4. 研究成果

- (1) 内因性カンナビノイド系を活性化することで臨界期の可塑性が再現するか

正常な臨界期である P25 の DGLα 欠損動物に内因性カンナビノイド受容体の作動薬 WIN55,212-2 を投与しながら片眼遮蔽を行い、一次視覚野ニューロンの眼優位性を評価した。その結果、多くのニューロンが健常眼により強く反応し、眼優位可塑性が発現していることが確認できた。このことは、内因性カンナビノイド 2-DG が CB 受容体を介して発現する機能の欠損が、DGLα 欠損動物で P25 で眼優位可塑性が見られない原因であることを示している。また、内因性カンナビノイドの量により臨界期タイミングを早めたり遅らせたりできることを示唆している。

- (2) 視覚野の抑制性神経回路の発達に変化はあるか

臨界期前 (P17) の動物の視覚野スライス標本で、錐体細胞よりホールセル記録を行い mIPSC を計測した。その結果、DGLα 欠損動物で眼優位可塑性が見られる L2/3 において mIPSC の頻度が有意に増大していることが明らかとなった (図 2)。このことから、臨界期前の DGLα 欠損動物では野生型に比較して抑制性神経回路の働きが亢進しているものと考えられる。

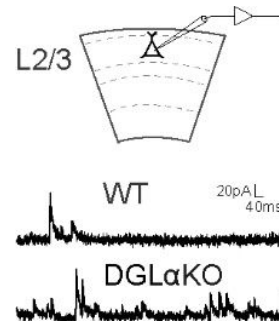


図 2. 視覚野スライス標本で 2/3 層錐体細胞よりホールセル記録を行った(上)。下のトレースは野生型、DGLα 欠損動物での mIPSC 例を示す。

(3) 視覚野の抑制機能を操作することで臨界期タイミングを正常に戻せるか

臨界期前 (P17) では、野生型動物では眼優位可塑性が見られないが、DGL α 欠損動物では観察される。この生後齢の DGL α 欠損動物で亢進していると考えられる抑制性神経回路の機能を、GABA 受容体の逆作動薬 DMCM で減弱させながら片眼遮蔽を行ったところ、眼優位可塑性は見られなくなった (図 3)。したがって、臨界期前の DGL α 欠損動物における眼優位可塑性は、抑制性神経回路の機能亢進が原因であると考えられる。

以上より、DGL α 欠損動物では野生型よりも抑制機能が亢進することで、臨界期のタイミングが早期にシフトしていると考えられる。

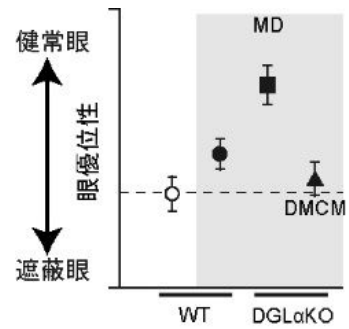


図 3. P17 の各動物グループの眼優位性。左 () は正常動物で、網掛けの 3 グループは片眼遮蔽 (MD) を施したものの。右端が DGL α 欠損動物に DMCM を投与したものの。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ikenari T., Kurata H., Satoh T., Hata Y, and Mori T. | 4. 巻 425 |
| 2. 論文標題 Evaluation of Fluoro-Jade C staining: Specificity and application to damaged immature neuronal cells in the normal and injured mouse brain | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 146-156 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.11.029 | 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 Kameyama K., Ohbayashi T., Uehara K., Koga A. and Hata Y. | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 The influence of illumination color on the subjective visual recognition of biological specimens | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Yonago Acta Medica | 6. 最初と最後の頁 266-271 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2020.11.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Gotou T., Kameyama K., Kobayashi A., Okamura K., Ando T., Terata K., Yamada C., Ohta H., Morizane A. and Hata Y. | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Dark rearing promotes the recovery of visual cortical responses but not the morphology of geniculocortical axons in amblyopic cat | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits | 6. 最初と最後の頁 637638 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2021.637638 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 池成拓哉、藏田洋文、佐藤武正、畠 義郎、森 徹自 |
| 2. 発表標題 Fluoro-Jade C 染色は変性成熟ニューロン特異的な検出方法か？ |
| 3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 嶋 義郎 |
| 2. 発表標題 弱視動物の視覚伝導路への暗所飼育による回復効果 |
| 3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 嶋 義郎、後藤隆浩、小林綾音、岡村佳代子、安藤貴彦、寺田慧子、山田 慧、森實彩馨、大田裕之、亀山克朗 |
| 2. 発表標題 Dark rearing restores the visual response of cortical neurons but not the morphology of input axons in amblyopic cat |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 亀山克朗、嶋 義郎 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 三輪書店 | 5. 総ページ数 27 |
| 3. 書名 「小児の弱視と視機能発達」第1章 7-A) 動物モデル | |

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 医療用無影灯 | 発明者 高本 智仙、嶋 義 郎、亀山 克朗 他5 名 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-153318 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 亀山 克朗 (KAMEYAMA Katsuro) (80446517) | 鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (15101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |