

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17023021
 研究課題名（和文） 発達期小脳における神経活動依存的なシナプス機能成熟
 研究課題名（英文） Studies on activity-dependent maturation of synaptic function during postnatal cerebellar development

研究代表者
 狩野 方伸 (KANO MASANOBU)
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：40185963

研究成果の概要（和文）：発達脳における不用なシナプス結合の除去と有用な結合の強化固定化の機構を解明するため、小脳の登上線維とプルキンエ細胞間のシナプスをモデルとして研究を行った。登上線維シナプスの生後発達が、1本の登上線維の選択的強化、強化された登上線維の樹状突起への移行、前期除去課程、後期除去課程の4過程から成ることや、各過程の分子機構の一端を解明した。また、登上線維応答の生後発達を *in vitro* で再現することに成功し、新規分子群の探索と機能解析の効率化を図った。5年の研究で、当初の目的をほぼ達成することができた。

研究成果の概要（英文）：This research aimed at elucidating the mechanisms underlying strengthening of necessary synaptic connections and elimination of redundant ones during postnatal development of the brain. For this purpose, we used climbing fiber to Purkinje cell synapses in the cerebellum as a model system. We have disclosed that postnatal development of climbing fiber to Purkinje cell synapse consists of four distinct phases: (1) functional differentiation, (2) dendritic translocation of a single climbing fiber, (3) early phase of synapse elimination, (4) late phase of synapse elimination. We have elucidated part of the molecular mechanisms underlying each of the four phases. Moreover, we have established an organotypic coculture preparation of cerebellar slices with medulla explants containing the inferior olive. In this preparation, formation and elimination of climbing fiber synapses occur in a manner similar to those seen *in vivo*. This preparation can be used for screening candidate molecules that may be involved in the development of climbing synapses. Through the five years' research, we have achieved most of the original purposes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	54,700,000	0	54,700,000
2006年度	49,900,000	0	49,900,000
2007年度	49,200,000	0	49,200,000
2008年度	48,800,000	0	48,800,000
2009年度	48,500,000	0	48,500,000
総計	251,100,000	0	251,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般、神経筋肉生理学

キーワード：分子・細胞神経科学、ニューロン・シナプス・神経回路、神経発生・神経発達・神経再生・神経再建、姿勢・運動制御

1. 研究開始当初の背景

生後間もない発達初期の神経系には一時的に過剰なシナプス結合が存在する。この時期のシナプスは機能的に未成熟であり、個体としても脳機能は未熟な状態にある。成長につれて、不要なシナプス結合は除去され、有用なものが強化固定化されて、成熟した機能的神経回路網が形成される（シナプスの刈り込み）。このメカニズムについては、末梢の神経筋シナプスにおいてよく研究されてきたが、中枢神経系においては、ニューロンの入出力関係が複雑であることと、単一シナプス入力の解析が困難なために、シナプスの刈り込みのメカニズムはよく分かっていなかった。1970年代から1980年代前半にかけて、Marianiら、Crepelら、及びStrataらによって、生後発達期の小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスに刈り込みがおこることが報告され、その経過が詳細に調べられた。また、様々な自然発生ミュータントマウスや生後の顆粒細胞の細胞分裂を阻害した動物の観察から、多重支配から単一支配研究には、平行線維（顆粒細胞の軸索）とプルキンエ細胞樹状突起の間の興奮性シナプスが正常に形成されることが必要であることが明らかになった。私たちは、1990年代中期から遺伝子改変マウスと小脳スライスからのホールセルパッチクランプ法を用いて、発達期小脳登上線維の刈り込みの分子機構を研究してきた。本研究開始時点で、マウスでは生後15日と16日がNMDA型グルタミン酸受容体を介する神経活動に依存する臨界期であり、その過程に代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)とその下流のシグナル伝達系が関与することを解明していた(Kano et al. 2008)。さらに、登上線維シナプスが形態学的に「除去」される数日前から、機能的な変化が進行しており、この時期のプルキンエ細胞は、1本の強い登上線維とそれ以外の弱い登上線維によって支配されていること、強い登上線維と弱い登上線維の違いはシナプス終末からの神経伝達物質放出の強さの違いに原因があることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

中枢神経系におけるシナプスの刈り込みの単純な例として、小脳の登上線維とプルキンエ細胞のシナプスがある。成熟動物では小脳プルキンエ細胞は殆どが1本の登上線維に

よって支配されるが、発達初期には4本以上の登上線維の支配を受けている。発達につれて過剰な登上線維が「除去」され、残存すべき1本の登上線維が「強化」されて、マウスでは生後約20日までに成熟型の1対1の結合が完成する。本研究では、発達期小脳においてシグナル伝達系を改変するマウスを作製し、詳細な電気生理学的及び形態学的解析により、種々の小脳細胞のうちどの部位の神経活動が必須かを明らかにし、さらに神経活動（電気信号）を細胞内シグナル（生化学反応）に変換する分子実体と「除去」と「強化」の実行分子の同定をめざす。

3. 研究の方法

(1) 小脳スライスを対象とした電気生理学的解析

様々な生後日齢の正常マウス(C57BL/6)及び各種の遺伝子改変マウスをCO₂で麻醉し、小脳のブロックを取り出して、氷冷下のリンゲル液中で300μmの厚さの小脳スライスを作製した。1時間程度室温のリンゲル液中で回復させた後、記録用チェンバーに移し、水浸対物レンズ付きの正立顕微鏡下で、スライス内のプルキンエ細胞から、直視化にホールセルパッチクランプ記録を行った。顆粒細胞層やプルキンエ細胞の周囲にガラス管の刺激電極を置き登上線維を刺激した。刺激強度と位置を系統的に変えて、プルキンエ細胞に誘発される興奮性シナプス後電流(EPSC)のステップの数によって、記録しているプルキンエ細胞を支配している登上線維の数を評価した。

(2) 麻醉下ラット小脳の電気生理学的解析
生後4~15日齢のラットをケタミンとキシラジンで麻醉して脳定位固定装置に固定し、ブラインドのホールセルパッチクランプ法によって、プルキンエ細胞からプルキンエ細胞の膜電位応答を記録した。

(3) 小脳-延髄共培養標本の開発

生後10日齢のラットあるいはマウス脳から(1)で述べた方法によって小脳スライスを作製した。また、胎生15日目のラット胎児脳から下オリブ核を含む延髄組織を取り出し、小脳スライスに接触させて共培養した。共培養7日目以降に、プルキンエ細胞からホールセル記録を行い、延髄組織片を電気刺激した時の活動電位やEPSCを記録した。

(4) 形態学的解析

登上線維終末のマーカである type 2 vesicular glutamate transporter (VGluT2) の免疫組織学によって登上線維の支配領域を評価した。また、延髄下オリブ核に順行性トレーサーの biotinylated dextran amine (BDA) を注入して一部の登上線維を標識し、VGluT2 との免疫二重染色によって登上線維の多重支配の様子を可視化した。同じプルキンエ細胞が、BDA と VGluT2 の 2 重陽性の登上線維終末と VGluT2 単独陽性の登上線維終末の両方を持つ場合には、そのプルキンエ細胞は 2 本以上の登上線維に多重支配されていることが分かる。

4. 研究成果

(1) 発達に伴う登上線維シナプスの樹状突起への移行とシナプス除去との関連 (Hashimoto et al. 2009)

生後間もないマウスの登上線維シナプスは、プルキンエ細胞の細胞体上にあるが、成熟したマウスでは登上線維シナプスはプルキンエ細胞の樹状突起にあって細胞体には存在しない。したがって、生後発達に伴って、登上線維シナプスの位置が細胞体からプルキンエ細胞から樹状突起へ移行することになる (climbing fiber translocation)。この現象と過剰な登上線維シナプス除去との関係を電気生理学的に調べるため、 Sr^{2+} 存在下で登上線維を刺激し、刺激に非同期に発生する微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。mEPSC の立ち上がり時間は、シナプスの細胞体からの電気緊張の距離を反映する。そこで、mEPSC の立ち上がり時間から、登上線維シナプスのプルキンエ細胞樹状突起における位置を推定した。また、上記の電気生理学的データを形態学的に確認するため、登上線維終末のマーカである VGluT2 の免疫組織学によって登上線維の支配領域を評価し、また、延髄下オリブ核に BDA を注入して一部の登上線維を標識し、VGluT2 との免疫二重染色によって登上線維の多重支配の様子を可視化した。

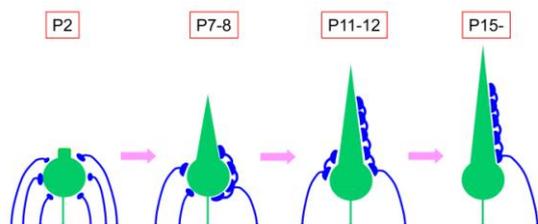


図 1. 登上線維シナプスの生後発達

その結果、生後 7-8 日では、既に最も優勢な登上線維 (CF-multi-S) とそれ以外の弱い登上線維 (CF-multi-W) に機能的な分化が終了しているが、どちらの登上線維シナプスもプルキンエ細胞の細胞体に局限しているこ

とが明らかになった (図 1、P7-8 の状態)。生後 9 日から 14 日にかけて、CF-multi-S は樹状突起にシナプスを形成して支配領域を拡大するが、CF-multi-W の支配領域は細胞体と最も太い樹状突起の基部に局限していた (図 1、P11-12 の状態)。そして、生後 15 日頃に、この細胞体周辺のシナプスが消失することにより、登上線維の単一支配が完成することが明らかになった (図 1、P15- の状態)。

(2) P/Q 型カルシウムチャネルの役割
高閾値型の P/Q 型カルシウムチャネルのノックアウトマウスと、新たに作製したプルキンエ細胞特異的な P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスの電気生理学的及び形態学的解析を行った。これらのマウスでは生後第 1 週に起こる除去過程が進行せず、また同時に起こる 1 本の登上線維の選択的強化も起こらないことが判明した。したがって、これらの現象にプルキンエ細胞の P/Q 型チャネルを介する活動が必須で、それ以外の部位の P/Q 型チャネルは関係しないことが判明した。

(3) 登上線維シナプスの生後発達は 4 過程から成る (Hashimoto et al. 2009; Kano & Hashimoto, 2009)

生後 3 日からのマウス登上線維シナプスの発達を電気生理学的に系統的に解析した。また、平行線維-プルキンエ細胞シナプス形成が低下しているデルタ 2 型グルタミン酸受容体 (GluD2) ノックアウトマウスと、P/Q 型カルシウムチャネルのノックアウトマウスを比較検討した。その結果、登上線維シナプスの生後発達に関して、従来考えられてきたように、前期除去過程と後期除去過程の 2 期に分けるのではなく、1) 1 本の登上線維の選択的強化と機能分化 (生後 3 日から 7 日)、2) 前期除去過程 (生後 7 日から 11 日)、3) 後期除去過程 (生後 12 日以降) の 3 期に分類することが妥当であることが明らかになった。さらに、2) と 3) に並行して、4) 登上線維シナプスの樹状突起への移行 (生後 9 日以降) が起こる。このうち、1)、2)、4) にプルキンエ細胞の P/Q 型カルシウムチャネルを介するカルシウム流入が、3) には平行線維シナプス形成が必須の要件であることが明らかとなった。

(4) GABA 作動性の抑制性シナプスの役割
柳川らによって作製された GAD67-GFP (Δneo) knock-in mouse (GABA 合成酵素のひとつである GAD67 の遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしたマウス、GAD67^{+GFP} と表記) を用いて、GABA 作動性伝達が登上線維シナプスの生後発達に果たす役割を調べた。GAD67^{+GFP} マウスでは、生後 11 日目以降の登上線維の除去に障害が認められた。GAD 阻害剤 (3-メルカプトプロピオン酸) を含む Elvax 片を生後 10 日目に正常マウスの小脳皮質表面に処置し、生後 22 日以降に電気生理学的に調べると、登上線維による多重支配の残存

が認められた。一方、生後 17 日目に処置したものは異常はみられなかったことから、生後 10 日から 17 日の間の小脳の GAD 活性の低下が多重支配の原因であると考えられた。幼若期には、GABA は GABA_A 受容体を介して大部分のプルキンエ細胞を興奮させたが、生後 10 日目以降は大部分が GABA によって抑制された。したがって、GAD67^{+/GFP} では、生後 10 日目以降のプルキンエ細胞への GABA 抑制の減弱が登上線維シナプス除去の異常を引き起こすと考えられた。そこで、生後 10-15 日目で微小抑制性シナプス電流 (mIPSC) を比較したところ、GAD67^{+/GFP} マウスでは mIPSC の振幅が有意に減少していた。さらに、GABA_A 受容体機能を増進するジアゼパムを Elvax によって GAD67^{+/GFP} の小脳皮質に生後 10 日目から投与したところ、登上線維シナプス除去はほぼ正常に回復した。以上から、生後 10 日目以降の GABA_A 受容体を介する抑制が、小脳登上線維シナプス除去を制御する重要な因子であると考えられる。

(5) 登上線維応答の生後発達の動物個体 (*in vivo*) 小脳を対象にした解析
 発達期の動物個体 (*in vivo*) の小脳において、どのような神経活動がシナプスの刈り込みに関わるかを調べるため、生後 4~15 日齢の麻酔下のラット小脳において、ホールセルパッチクランプ法によりプルキンエ細胞の膜電位応答を記録した。生後 11 日齢以降では、成熟ラットで観察されるのと同様に、自発的な登上線維入力による典型的な複雑スパイクが観察された (図 2 A)。一方、生後 4~10 日齢では、複雑スパイクとは異なるタイプの自発的なバースト状発火が観察された (平均 3 発、~100Hz: 以下、バースト発火、図 2 A)。また、生後 8~10 日齢では、バースト発火と複雑スパイクの両方が観察された。バースト発火と複雑スパイクは、その直前に複数の興奮性シナプス後電位 (EPSP) を伴っており、この EPSP の数は発達に伴って減少した (図 2 B)。発達期ラットのラット小脳スライス標本を用

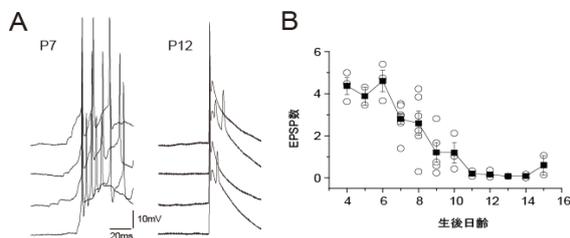


図 2. *In vivo* の幼若ラット小脳における登上線維応答

いて、プルキンエ細胞を支配する登上線維の本数を評価したところ、登上線維数の発達に伴う減少は、バースト発火と複雑スパイクの直前にみられる EPSP の数の発達に伴う減少

の経過とほぼ一致した。したがって、プルキンエ細胞を多重支配する複数の登上線維の群発によってバースト発火が生じ、発達につれて 1 本の登上線維が強化され、その他が除去されるにつれて、複雑スパイクが起こるようになると考えられる。

(6) 小脳-延髄共培養標本の開発
 新規分子群の探索と機能解析を効率よく行うための実験系として、薬物投与や遺伝子発現の操作が容易であり、かつ *in vivo* で起こる登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達を再現した組織培養標本の開発を目指した。生後 10 日齢のラットあるいはマウス脳から小脳スライスを作製し、また、胎生 15 日目のラット胎児脳から下オリブ核を含む延髄組織を取り出し、それらを共培養した。共培養 7 日目以降に、プルキンエ細胞からホールセル記録を行い、延髄組織片を電気刺激した時の活動電位や興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。延髄の刺激により、“複雑スパイク” 登上線維シナプス様 EPSC が記録された。また、共培養した小脳のプルキンエ細胞の樹状突起周囲に、VGLUT2 陽性の登上線維終末が豊富に存在することを確認した。これらの結果は、培養下でプルキンエ細胞に登上線維シナプスが形成され、そのシナプスの性質が *in vivo* や急性スライス標本で明らかにされた性質と同等であることを示している。さらに、各プルキンエ細胞を支配する登上線維数の培養日数に伴う変化を解析したところ、培養 7-9 日目から培養 14-16 日目にかけて個々のプルキンエ細胞を支配する登上線維の本数が減少した。今後、共培養下で起こる登上線維シナプス除去の機構が、*in vivo* で起こるシナプス除去の機構と同じであるかを、薬理学的実験、遺伝子欠損マウスからの共培養、RNAi による機能分子ノックダウンなどにより検討する。

(7) 成熟動物小脳における登上線維シナプスの活動依存性維持 (Kakizawa et al. 2005)
 最後に、成熟動物の小脳において、登上線維シナプスがどのように維持されるかを調べた。Na⁺チャンネルのブロッカーのテトロドトキシン (TTX) または AMPA 型グルタミン酸受容体のブロッカーの NBQX を含む Elvax 片を生後 24 日のマウスの小脳皮質表面に処置した。3 日から 7 日後に小脳スライスを作製し、プルキンエ細胞から登上線維応答を記録するとともに、登上線維の形態学的解析を行った。TTX 及び NBQX が有効に作用していることは、rotorod test によって、マウスに運動協調障害が生ずることを指標にして確認した。TTX による神経活動の持続的遮断及び NBQX による興奮性シナプス応答の持続的遮断により、形態学的に登上線維が退縮し、機能的にはシナプス前終末からの伝達物質放出が弱まることがわかった。この原因は伝達物質放出確

率の低下ではなく、放出部位の減少であることが明らかになった。成熟動物の小脳において、AMPA型グルタミン酸受容体を介するプルキンエ細胞の活動に依存した何らかの逆行性シグナルによって、登上線維の機能と形態を維持していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計46件)

① Hashimoto, K., Ichikawa, R., Kitamura, K., Watanabe, M. & Kano, M. Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum. *Neuron* **63**, 106-118 (2009) (査読有).

② Kano, M. & Hashimoto, K. Synapse elimination in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 154-161 (2009) (査読有).

③ Hashimoto, K., Yoshida, T., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M. & Kano, M. Influence of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuroscience* **162**, 601-611 (2009) (査読有).

④ Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **89**, 309-80 (2009) (査読有).

⑤ Kano, M., Hashimoto, K. & Tabata, T. Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **363**, 2173-2186 (2008) (査読有).

⑥ Kamikubo, Y., Tabata, T., Kakizawa, S., Kawakami, D., Watanabe, M., Ogura, A., Iino, M. & Kano, M. Postsynaptic GABA_B receptor signalling enhances LTD in mouse cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* **585**, 549-563 (2007) (査読有).

⑦ Kishimoto, Y. & Kano, M. Endogenous cannabinoid signaling through the CB₁ receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J. Neurosci.* **26**, 8829-8837 (2006) (査読有).

⑧ Kakizawa, S., Miyazaki, T., Yanagihara, D., Iino, M., Watanabe, M. & Kano, M. Maintenance of presynaptic function by AMPA receptor-mediated excitatory postsynaptic activity in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 19180-19185

(2005) (査読有).

〔学会発表〕(計73件)

① Kano, M. Activity-dependent regulation of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. Gordon Research Conference on Neural Circuits & Plasticity. Jun 8, 2009. Newport, RI, USA.

② Kano, M., Hashimoto, Y., Ohno-Shosaku, T. & Fukami, K. Mechanisms of Ca²⁺-driven endocannabinoid release: A pharmacological and genetic approach. 17th Neuropharmacology Conference "Cannabinoid signaling in the nervous system." Oct 31, 2007. San Diego, USA.

〔図書〕(計3件)

① Tabata, T. & Kano, M. Synaptic plasticity in the cerebellum. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 3rd Edition Neural Signaling Mechanisms*. Abel Lajtha (ed), K. Mikoshiba (Volume ed), Springer Science Business Media, LLC., 63-86, (2009).

② 田端俊英、狩野方伸：小脳におけるシナプス可塑性。(シリーズ 脳科学5、分子・細胞・シナプスからみる脳：甘利俊一／監修、古市貞一／編) 7. 3節 pp230-263、東京大学出版会 (2008).

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 方伸 (KANO MASANOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40185963

(2) 研究分担者

崎村 建司 (SAKIMURA KENJI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

(H17→H21)

岡部 繁男 (OKABE SHIGEO)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60204012

(H20→H21)

(3) 連携研究者

なし