

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究(S)  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17100004  
 研究課題名(和文) 内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達のメカニズムとその生理的意義の解明  
 研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms and physiological significance of endocannabinoid-mediated retrograde synaptic modulation  
 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)：脳内に存在するマリファナ類似物質(内因性カンナビノイド)はニューロンのシナプス後部から放出され、逆行性にシナプス前終末のカンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体に作用して、神経伝達物質放出の減少を引き起こす。本研究では、内因性カンナビノイドのシナプス伝達調節の機構とその脳機能における役割の解明を目指した。4年間の研究において、中枢シナプスにおける内因性カンナビノイドの生合成、放出、分解の分子機構をほぼ解明し、また、内因性カンナビノイド系の小脳運動学習への関与を証明するなど、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)：Endogenous cannabinoids (endocannabinoids) are released from neurons in the central nervous system in activity-dependent manners. The released endocannabinoids act retrogradely onto CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors on presynaptic terminals, and suppress neurotransmitter release. This study aimed at elucidating the molecular and cellular mechanisms of endocannabinoid release from central neurons and the roles of the endocannabinoid system in brain functions. We have found that the endocannabinoid release is triggered by strong depolarization of postsynaptic neurons and the resultant elevation of Ca<sup>2+</sup> concentration (Ca<sup>2+</sup>-driven endocannabinoid release [ER]), strong activation of G<sub>q/11</sub>-coupled receptors at basal intracellular Ca<sup>2+</sup> level (basal receptor-driven endocannabinoid release [RER]), or simultaneous Ca<sup>2+</sup> elevation and G<sub>q/11</sub>-coupled receptor activation (Ca<sup>2+</sup>-assisted RER). We have also disclosed that endocannabinoid signaling is required for motor learning in the cerebellum. Through the four 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	20,400,000	6,120,000	26,520,000
2006年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2007年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2008年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
総計	66,000,000	19,800,000	85,800,000

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

(1) マリファナの多様な精神神経作用は  $CB_1$  受容体を介する。

(2)  $CB_1$  受容体の内因性のリガンド (内因性カンナビノイド) の候補として、アナンダミドと 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) がある。

(3) 2001 年に狩野らと米国の 2 グループが、内因性カンナビノイドがシナプス後部からシナプス前終末に向けて逆行性にシグナルを伝達することを報告した。

(4) 内因性カンナビノイドのシナプス伝達調節の機構や高次脳機能における役割など多くの重要な点が未解決であった。

## 2. 研究の目的

(1) 内因性カンナビノイドの生合成、放出、分解の分子機構の解明

- ① 生合成経路の解明
- ② 生理的放出条件の解明
- ③ 分解経路の解明

(2) 内因性カンナビノイド系のシナプス可塑性と脳高次機能における役割の解明  
シナプス可塑性のメカニズムの解明と、行動解析に基づく内因性カンナビノイドの生理的役割の検討

## 3. 研究の方法

(1) 培養海馬ニューロンペアからの whole-cell recording。カンナビノイド高感受性の抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、シナプス後ニューロンからの内因性カンナビノイドの放出を検知した。

(2) マウスから小脳スライスプルキンエ細胞からの whole-cell recording。カンナビノイド高感受性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。固体レーザーと超高性能三次元空気ばね式除振装置を既存の 2 光子励起顕微鏡に組み合わせ、細胞内カルシウム濃度をリアルタイム計測した。

(3) マウス線条体スライスの中型有棘細胞 (Medium spiny neuron: MS neuron) から

whole-cell recording を行い、カンナビノイド高感受性の IPSC をバイオアッセイに用いた。

(4) 免疫蛍光法と免疫電顕法によって  $CB_1$ , DAGL 等の内因性カンナビノイドシグナル関連分子の小脳、海馬、線条体における局在を調べた。

(5) 内因性カンナビノイド系の遺伝子改変マウスに対して、各種行動解析を行った。特に、小脳依存性の運動学習パラダイムである瞬目反射条件付けと海馬依存性のモリス水迷路学習を重点的に調べた。

## 4. 研究成果

(1) 内因性カンナビノイドの生合成、放出、分解の分子機構の解明

### ① 生合成経路の解明

a) 脱分極後の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇により放出される内因性カンナビノイドは、アナンダミドではなく 2-AG であることを明らかにした。

b)  $G_{q/11}$  結合型受容体活性化、および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇と  $G_{q/11}$  結合型受容体活性化の相乗作用による内因性カンナビノイドの合成・放出に、海馬では PLC $\beta$ 1 が、小脳の前半部のプルキンエ細胞では PLC $\beta$ 4 が必須であることを明らかにした。

c) PLC $\beta$ 1 及び PLC $\beta$ 4 の活性が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に依存しており、 $G_{q/11}$  結合型受容体活性化と  $Ca^{2+}$  濃度上昇が同時に起こると相乗的に内因性カンナビノイドの放出が起こることを明らかにした。

d) 小脳スライスにおいて、 $G_{q/11}$  結合型の代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) の活性化と脱分極の同時刺激によって放出される 2-AG を生化学的に定量した。

e) 線条体スライスにおいて、大脳皮質から MS neuron への興奮性シナプスでは、脱分極により誘発される興奮の抑圧 (Depolarization-induced suppression of excitation: DSE) は起こらない。一方、 $G_{q/11}$  結合型の group I mGluR の活性化によって、内因性カンナビノイドを介する逆行性抑圧は起こり、また group I mGluR のアゴニスト存在下では DSE が生じた。

f) 線条体の MS neuron の抑制性シナプスでは、脱分極により誘発される興奮の抑圧 (Depolarization-induced suppression of inhibition: DSI) が効率よく生じた。

g) 海馬培養ニューロンにおいて NMDA 受容体を通して流入した  $Ca^{2+}$  によって 2-AG が産生され逆行性シナプス伝達抑制をおこすことを明らかにした。

## ② 生理的放出条件の解明

a)小脳スライスにおいて、興奮性の平行線維シナプス活動により、mGluR1 活性化と樹状突起の局所脱分極による  $Ca^{2+}$ 濃度上昇が起こり、内因性カンナビノイド放出がおこることを電気生理学的に示した。

b)線条体スライス標本において、コリン作動性介在ニューロンが持続的に発火しており、それによって供給されるアセチルコリンが  $G_{q/11}$  結合型の  $M_1$  ムスカリニック受容体を介して、MS neuron からの内因性カンナビノイド放出を持続的に増強していることを明らかにした。

c) 小脳スライスのプルキンエ細胞を用いて、 $CB_1$  の活性化が、微小シナプス後電流のうち、 $Ca^{2+}$  に関係なく発生する成分には影響せず、 $Ca^{2+}$  による増強成分のみを選択的に抑制することを明らかにした。

## ③ 分解経路の解明

a) 海馬培養細胞において、2-AG の分解酵素 monoacylglycerol lipase (MGL) が、細胞外の 2-AG 濃度を低く保っており、またシナプス後ニューロンから放出された 2-AG を分解して、逆行性シナプス抑制を終結させることを明らかにした。

b) MGL ノックアウトマウスを作成し、解析を始めた。MGL ノックアウトマウスでは、小脳において、脱分極後の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇により放出される内因性カンナビノイドの効果が有意に遷延していた。

## (2) 内因性カンナビノイド系のシナプス可塑性と脳高次機能における役割の解明

$CB_1$  受容体ノックアウトマウスでは、小脳依存性の運動学習パラダイムである瞬目反射条件付けが著しく障害されていた。また、MGL ノックアウトマウスでは、海馬依存性のモリス水迷路学習の獲得は正常であったが、消去が亢進していた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 40 件)

- ① Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Uchigashima M, Watanabe M: Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.*, (査読有), 89, 309-380, 2009.
- ② Kishioka A, Fukushima F, Ito T, Kataoka H, Mori H, Ikeda T, Itohara S, Sakimura K, Mishina M. A novel form of memory for auditory fear conditioning at a low-intensity unconditioned stimulus. *PLoS ONE*, (査読有), 4, e4157, 2009
- ③ Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Maejima T, Fukami K, Kano M: Pharmacological evidence for the

involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology* (査読有), 54, 58-67, 2008.

- ④ Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M: Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. *J Neurosci* (査読有), 27, 496-506, 2007.
- ⑤ Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M: Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci* (査読有), 27, 1211-1219, 2007.
- ⑥ Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona, I, Kano M, Watanabe M: Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci* (査読有), 27, 3663-3676, 2007.
- ⑦ Tabata T, Kawakami D, Hashimoto K, Kassai H, Yoshida T, Hashimoto Y, Fredholm B B, Sekino Y, Aiba A, Kano M: G protein-independent neuromodulatory action of adenosine on metabotropic glutamate signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol (Lond)* (査読有), 581, 693-708, 2007.
- ⑧ Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Ano M, Takeda S, Tsubokawa H, Kano M: Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond)*. (査読有), 584, 407-418, 2007.
- ⑨ Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M:  $Ca^{2+}$ -assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol* (査読有), 17, 360-5, 2007.
- ⑩ Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Kano M: Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* (査読有), 13, 127-137, 2007.
- ⑪ Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Watanabe M, Kano M: Roles of phospholipase C beta and NMDA receptor in activity-dependent endocannabinoid release. *J. Physiol. (Lond)*. (査読有), 584, 373-380, 2007.
- ⑫ Yamasaki M, Hashimoto K, Kano M: Miniature synaptic events elicited by

- presynaptic  $Ca^{2+}$  rise are selectively suppressed by cannabinoid receptor activation in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* (査読有), 26, 86-95, 2006.
- ⑬ Kishimoto Y, Nakazawa K, Tonegawa S, Kirino Y, Kano M: Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response. *J Neurosci* (査読有), 26, 1562-1570, 2006.
- ⑭ Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M: The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic site in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* (査読有), 26, 2991-3001, 2006.
- ⑮ Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M: Localization of diacylglycerol lipase- $\alpha$  around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* (査読有), 26, 4740-4751, 2006.
- ⑯ 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.
- ⑰ Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M: Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur J Neurosci* 24, (査読有), 2246-2252, 2006.
- ⑱ Maejima T, Oka S, Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M: Synaptically driven endocannabinoid release requires  $Ca^{2+}$ -assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C  $\beta$ 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci.*, (査読有), 25: 6826-6835, 2005.
- ⑲ 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*. (査読有), 102: 19180-19185, 2005.
- ⑳ Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Maejima T, Kano M: Calcium signaling and synaptic modulation: Regulation of endocannabinoid-mediated synaptic modulation by calcium. *Cell Calcium* (査読有), 38: 369-374, 2005.
- [学会発表] (計 30 件)
- ① Nakayama H, Strength of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated transmission is crucial for the late phase of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *Neuroscience* 2008, 2008.11.18, ワシントンDC, アメリカ
- ② Yamazaki M. Transmembrane AMPA receptor regulatory protein  $\gamma$ -8 is involved with the regulation of spontaneous activity and mental condition. *Neuroscience* 2008, 2008.11.17, ワシントンDC, アメリカ
- ③ Kawamura Y, Developmental changes in climbing fiber responses of cerebellar Purkinje cells revealed by whole-cell patch-clamp recordings in vivo. *Neuroscience* 2008, 2008.11.16, ワシントンDC, アメリカ
- ④ Hildebrand M E, Functional coupling between mGluR1 and Cav3.1 T-type calcium channels enhances cerebellar Purkinje cell excitability and local signaling., *Neuroscience* 2008, 2008.11.15, ワシントンDC, アメリカ
- ⑤ Kano M, Endocannabinoid-mediated retrograde synaptic modulation triggered by activation of group I mGluRs., 6th International Meeting of Metabotropic Glutamate Receptors, 2008.9.17, シチリア島、イタリア
- ⑥ Isope P, Functional coupling between mGluR1 and Cav3.1 T-Type calcium channels enhances cerebellar Purkinje cell excitability and local signaling. 6th FENS (Forum of European Neuroscience) 2008.7.15, ジュネーブ、スイス
- ⑦ Otsu Y, Gating of complex spike calcium transient by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. 6th FENS (Forum of European Neuroscience) 2008.7.15, ジュネーブ、スイス
- ⑧ Narushima-Takahashi M, Requirement of type 1 metabotropic glutamate receptor for activity-dependent synapse elimination in the lateral geniculate nucleus. 6th FENS (Forum of European Neuroscience) 2008.7.15, ジュネーブ、スイス
- ⑨ 鳴島円、代謝型グルタミン酸受容体1型による網膜-外側膝状体シナプス除去の調節、第31回日本神経科学大会、2008.7.10、東京国際フォーラム
- ⑩ 谷村あさみ、成熟マウス小脳平行線

維とプルキンエ細胞間の逆行性シナプス調節における内因性カンナビノイドの寄与、第31回日本神経科学大会、2008.7.9、東京国際フォーラム

- ⑪ 橋本谷裕樹、逆行性シナプス伝達抑制における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の産生と分解、第85回日本生理学会大会、2008.3.25、京王プラザホテル東京
- ⑫ Masanobu Kano, Mechanisms of endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. The joint meeting of the 10<sup>th</sup> Southeast Asian Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists (SEAWP-RMP) and the 41<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting of the Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists (ASCEPT), 2007.12.4, Adelaide, Australia
- ⑬ You Kumode, Protocadherin-alpha family in the olivo-cerebellar system; their isoform expression and loss of function analysis. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.7, San Diego, USA
- ⑭ Atsushi Aiba, mGluR1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.6, San Diego, USA
- ⑮ Sho Kakizawa, Junctophilin-mediated functional crosstalk between ryanodine receptors and SK channels essential for cerebellar long-term depression. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3, San Diego, USA
- ⑯ Yuji Kamikubo, GABA<sub>B</sub> receptor signaling enhances mGluR1 signaling and LTD in cultured cerebellar Purkinje cells. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3, San Diego, USA
- ⑰ Masanobu Kano, Mechanisms of Ca<sup>2+</sup>-driven endocannabinoid release: A pharmacological and genetic approach. 17<sup>th</sup> Neuropharmacology "Conference" "Cannabinoid signaling in the nervous system", 2007.11.1, San Diego, USA
- ⑱ 狩野方伸、中枢神経系における内因性カンナビノイド放出と逆行性シナプス抑制のメカニズム、第30回日本神経科学大会、2007.9.11、パシフィコ横浜
- ⑲ 内ヶ島基政、線条体における2-アラキドノイルグリセロールを介した逆行性シグナル伝達に関与する分子の細胞内配置、第30回日本神経科学大会、2007.9.10、パシフィコ横浜

- ⑳ Masanobu Kano, Phospholipase C $\beta$  as a neuronal coincidence detector. Life Science 2007, 2007.7.10, Glasgow, UK

[図書] (計9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：医学書院、長期抑圧（現代医学・生物学の仮説・学説2008）生体の科学 59：No.5、2008年、488 ページ
- ③ Ohno-Shosaku: T. Springer, New York Control of synaptic transmission in the CNS through endocannabinoid-mediated retrograde signaling. In: *Dendritic Neurotransmitter Release*. M. Ludwig (ed). 2005, p12
- ④ 狩野方伸：朝日新聞社、経験を積み重ねて作られる神経回路(朝日選書771「脳はどこまでわかったか」井原康夫編集)、2005年、19 ページ
- ⑤ 狩野方伸：クバプロ、小脳シナプスの機能発達と可塑性の機構。(ブレインサイエンスレビュー2005：伊藤正男・川合述史／編)、2005年、23 ページ

[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

少作 隆子 (SHOSAKU TAKAKO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60179025

### (3) 連携研究者

なし