

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K01971

研究課題名(和文)バーストと低周波入力で誘導する海馬CA1シナプス可塑性への内因性アデノシンの関与

研究課題名(英文)Effects of endogenous adenosine on hippocampal CA1 synaptic plasticity induced by synaptic inputs of hippocampal EEG patterns

研究代表者

藤井 聡 (Satoshi, Fujii)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：80173384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：海馬内のニューロンは、集団では低周波数で同期して興奮しつつ、個々が高周波数でバースト発火している。従って、海馬内ニューロンは低周波律動にバーストが重畳したシナプス入力でシナプス可塑性が誘導されている、と考えられる。

本研究では、海馬CA1領域での興奮性シナプス可塑性誘導において、「シナプスへのバースト入力と低周波入力がどのようにシナプス可塑性を誘導するか」を明らかにした。とくに、シナプス入力時にco-transmitterとして放出される内因性adenosineが抑制性ニューロン活動や興奮性ニューロンの脱分極を修飾する点に着目し、adenosineのシナプス可塑性誘導への関与を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「シナプスは入力周波数・入力時間を弁別して可塑性の方向を決定する」メカニズムの解明を目的とする。脳のニューロンは全として低周波数で同期して興奮しつつ、個々が高周波数でバースト発火している。ニューロンネットワーク内のシナプスには、高周波バーストと持続的な低周波入力が重畳して入力されて可塑性が誘導され「記憶情報」として蓄積される。

「記憶と学習の基礎過程としての海馬シナプス可塑性がその時点のシナプスの属するネットワークの活動性に影響される性質」に依存するならば、「シナプスが入力パターンに応じて可塑性が誘導されるメカニズム」を解明することは、記憶や学習のメカニズムを解明するうえで重要である。

研究成果の概要(英文)：Neurons in the hippocampus fire synchronously at low frequencies in groups and burst at high frequencies individually. Therefore, synaptic plasticity is considered to be induced in hippocampal neurons by synaptic inputs in which bursts are superimposed on low-frequency rhythms.

In this study, we clarified "how burst input and low-frequency input to synapses induce synaptic plasticity" in the induction of excitatory synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. In particular, we focused on the fact that endogenous adenosine, which is released as a co-transmitter during synaptic input, attenuates synaptic transmissions in the inhibitory circuits and modulates the depolarization and excitatory neurons, and elucidated the involvement of adenosine in the induction of synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons.

研究分野：Neurophysiology

キーワード：hippocampus EEG synaptic plasticity LTP LTD adenosine IP3 receptors inhibitory interneurons

## 1. 研究開始当初の背景

海馬領域の代表的なシナプス伝達可塑性として、長期増強 (Long-term potentiation, LTP) と長期抑圧 (Long-term depression, LTD) が挙げられる。申請者らはこれまで、海馬スライス CA1 ニューロンに 0.5-10Hz の低周波数刺激でシナプス可塑性を誘導する場合、1Hz で LTD が誘導され、5-10Hz で LTP が誘導されることを示した。( Fujii et al. Neurosci. 168, 346-358, 2010 )。同研究結果を他研究結果 ( Fujii et al. Eur. J. Pharmacol., 331, 9-14, 1997; J. Physiol., 521,451-466 1999; Neurosci. Lett., 279, 121-124, 2000 ) と併せて、次のように結論した。

1. 海馬CA1ニューロンで、興奮性シナプスに低周波数入力して誘導したLTDないしLTPいずれも、シナプス後細胞のNMDA型受容体 (NMDARs) と adenosine A1 受容体 (AdoA1R)のactivationが必要である。
2. 興奮性シナプスに低周波数入力した場合は、入力周波数に応じてAdoA1R活性化が関与している。1Hzシナプス入力によるLTD誘導、および、5-10Hzのシナプス入力によるLTP誘導において、NMDARsの活性化と共役する。

申請者らは、また、海馬スライス CA1 ニューロンに 30-100Hz の高周波数のバースト入力刺激で誘導した LTP の性質を検討し、以下 1-3 の結論を得ている ( Fujii et al., J. Physiol., 521,451-466 1999, Yoshioka, Yamazaki, Fujii et al. Neurosci. Res. 67, 149-155, 2010 )。

1. 高周波数バースト入力で誘導するLTPにAdoA1R, AdoA2Rが関与する。
2. CA1興奮性シナプスでAdoA1Rが活性化するとLTP誘導が抑制される。
3. 高周波バースト入力では代謝型グルタミン酸受容体metabotropic glutamate receptors (mGluRs)-イノシトール3リン酸inositol 1,4,5-trisphosphate receptors受容体(IP3Rs)が活性化してCA1シナプス後細胞で抑制性入力が増大しLTP誘導が阻害される。

海馬 CA1 領域の興奮性シナプスでの NMDARs 活性化には、シナプス入力に応じてシナプス間隙に放出・蓄積される内因性 adenosine と glutamate の両者が関与する。シナプス間隙に放出・蓄積された内因性 adenosine がシナプス前膜の AdoAR1 を活性化すると、Gi サブタイプ G タンパク質活性でシナプス前からの glutamate 放出が抑制される。また、シナプス後膜 AdoA1R の活性化により K<sup>+</sup>チャンネルが活性化して後ニューロンが過分極応答する ( Siggins and Schubert, Neurosci. Lett. 23, 55-60, 1981; Lee and Schubert, Brain Res. 246, 311-314, 1982, 黒田洋一郎, 神経生化学, 757-767, 1990 )。さらに、抑制性ニューロンシナプスの AdoA1R 活性化でシナプス伝達が阻害されて興奮性ニューロンへの抑制が軽減する、その結果、興奮性シナプスで NMDARs の活性化が促進され LTP/LTD 誘導が修飾される、と考えられた。しかし、低周波律動にバーストが重畳した入力刺激で誘導するナプス可塑性メカニズムへの内因性 adenosine 関与の詳細は検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、海馬 CA1 領域で興奮性シナプス可塑性が誘導される際に、「シナプスへのバースト入力と低周波入力の重畳で、どのようにシナプス可塑性が誘導されるか」を解明することである。本研究では、内因性 adenosine が抑制性ニューロン活動を抑制して興奮性ニューロンの脱分極を促進する点に着目し、シナプス入力時に co-transmitter として放出される内因性 adenosine がシナプス可塑性誘導の周波数弁別にどのように関与するか、を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) CA1 興奮性シナプスで誘導される長期増強(long-term potentiation, LTP)、長期抑圧(long term depression)および depotentiation の解析方法

内因性 adenosine は、錐体細胞と抑制性介在ニューロンで形成されるシナプスでアデノシン A1 受容体 AdoA1R 活性化を通じて、グルタミン酸放出を阻害しシナプス間隙のグルタミン酸濃度を制御している可能性がある。抑制性介在ニューロンをバースト刺激で興奮させる際に、AdoA1R を抑制するとシナプス前終末からのグルタミン酸放出が増大し、抑制性ニューロン活動が増強すると予想される。

そこで、単発刺激 2-4 発のバーストを 20 秒間隔で入力しながら AdoA1R 阻害薬(8-Cyclopentyltheophylline, 8-CPT)、NMDAR 阻害薬( D, L-2-Amino-5-Phosphonovaleric acid, AP5) ,  $\gamma$ -aminobutyric acid typeA 受容体(GABA<sub>A</sub>R)作動薬 muscimol, ( IP3Rs ) 受容体阻害薬(2-Aminoethoxydiphenylborane, 2-APB)を与え、その前後、CA1 領域で細胞外記録して計測した EPSP の初期の傾き(slope of field EPSP, S-EPSP)ないし population spike の振幅 (PS amplitude) の経時的な変化を検討し、two-tailed student-t test により解析した。

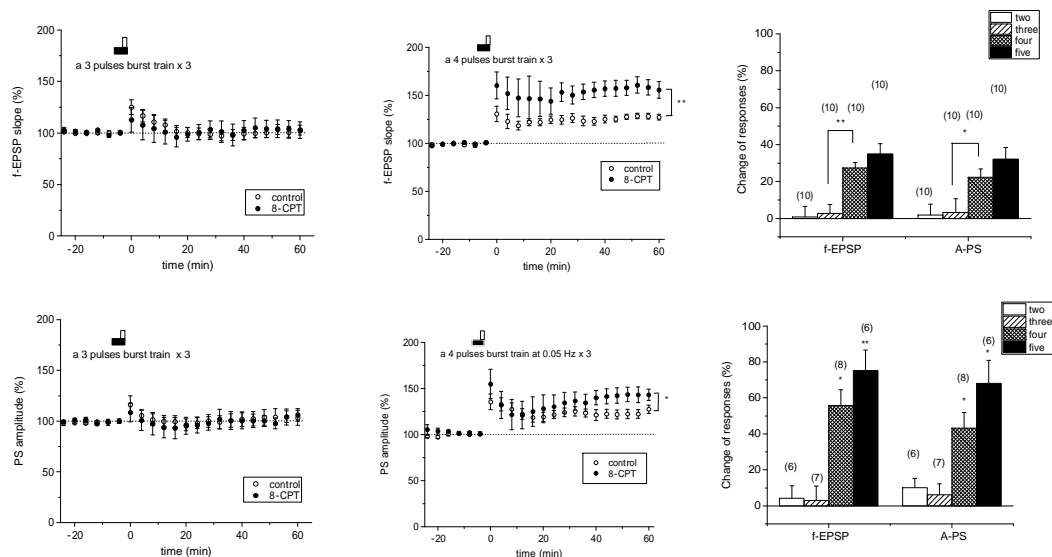
## (2) CA1 抑制性介在ニューロン回路機能の制御の解析方法

上記の薬物投与の前後で 10 msec の間隔で CA1 シナプスに 2 発シナプス入力(paired-pulse stimulation)し、錐体細胞層から導出した 2 発目の population spike の振幅に誘導される応答抑制(paired-pulse inhibition, PPI)の変化を観察した。

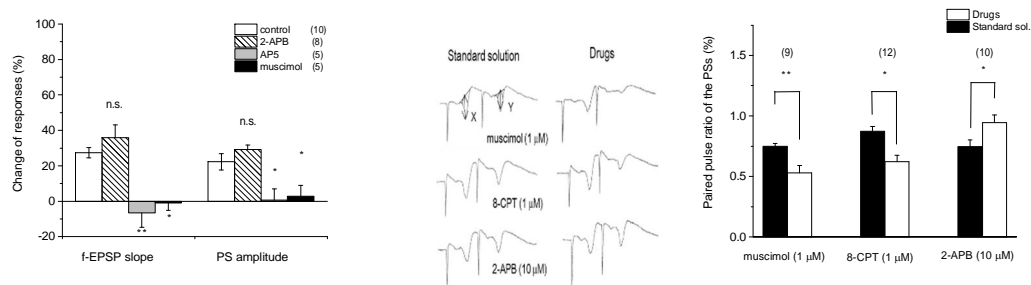
## 4. 研究成果

### (1) 高周波バースト刺激による LTP 誘導実験

Standard solution 灌流下に 海馬 CA1 シナプスに 100Hz, 2-5 発のバースト刺激を 20 秒おきに 3 回入力して LTP 誘導を検討した。LTP 誘導の閾値となる pulse number を求め、閾値で誘導した LTP に対して AdoA1R 阻害薬 (8-CPT, 1 $\mu$ M) , NMDARs 阻害薬(AP5, 50 $\mu$ M), IP3Rs 阻害薬 (2-APB, 10  $\mu$ M) および GABA<sub>A</sub>R 作動薬(muscimol, 1 $\mu$ M)を検討した。



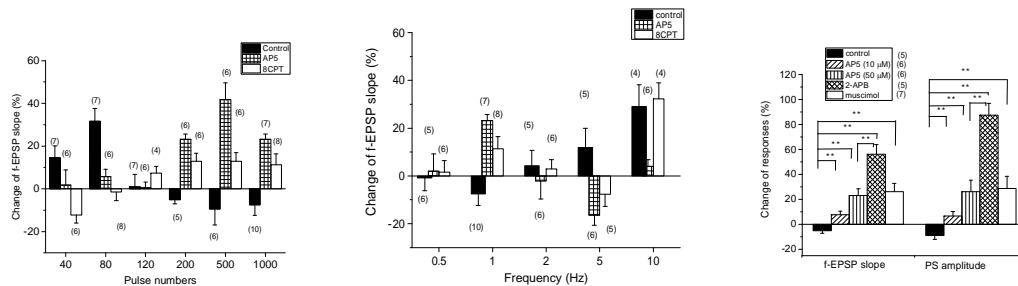
**図1** . 100Hz、20 秒ごとに 3 バースト train を与える際、バーストを 2 から 5 pulse まで変化させて LTP 誘導をした。各バースト train を入力する際に、8-CPT (1  $\mu$ M) を灌流液に投与してその効果を非投与例と比較し検討した。(左) 各バースト train を 3 pulses とした場合の f-EPSP slope の変化(上)と PS amplitude の変化(下)。(中) 各バースト train を 4 pulses とした場合の f-EPSP slope の変化(上)と PS amplitude の変化(下)。LTP が誘導され、誘導された LTP は 8-CPT で有意 (\*\* $P < 0.01$ ) に増強された。上段(右) 各バースト train の pulse 数とバースト刺激 60 分後の f-EPSP slope ないし population spike amplitude (PS amplitude) 増大率との関係。下段(右) 8-CPT を投与した際の各バースト train の pulse 数とバースト刺激後の f-EPSP slope ないし population spike amplitude (PS amplitude) の増大率との関係。Standard solution で誘導された control LTP と比較して 8-CPT 投与下で LTP は有意 (\* $P < 0.05$  ないし \*\* $P < 0.01$ , student t-test) に増大した。



**図 2.** (左) 2-APB (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M), muscimol (1  $\mu$ M)を灌流しながら 100Hz、20 秒ごとに発数 4 pulses のバーストを 3 trains 与えた場合の LTP 誘導。バースト刺激 60 分後の f-EPSP slope および PS amplitude の変化を示す。(右) muscimol (1  $\mu$ M) , 8-CPT (1  $\mu$ M), 2-APB (10  $\mu$ M)投与前後の paired-pulse inhibition (PPI) の変化。Muscimol および 8-CPT で PPI は有意 (\* $P$ <0.05 ないし\*\* $P$ <0.01)に増強し、2-APB では有意 (\* $P$ <0.05)に減弱した。

### (2) 低周波数単発入力刺激で誘導される CA1 シナプス可塑性の検討

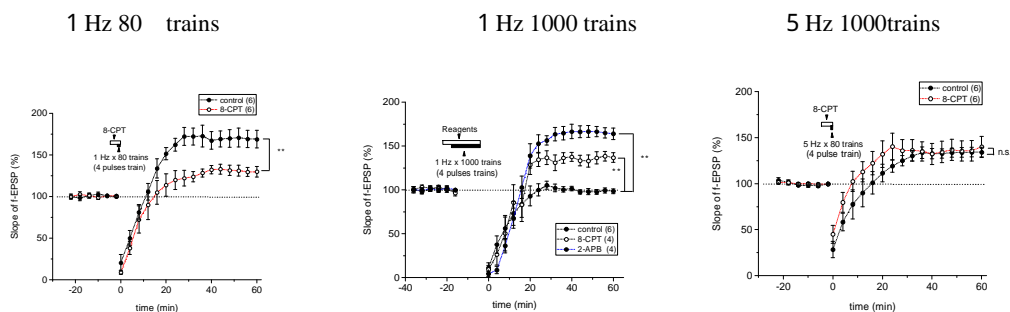
0.5-10 Hz の単発シナプス入力 single pulse train で海馬 CA1 ニューロンに誘導される LTP-LTD の性質について検討した。Standard solution 灌流下に Single pulse train を 1Hz で 40 発から 1000 発までシナプス入力、ないし、0.5, 1, 2, 5 および 10Hz で 1000 発シナプス入力して誘導した LTP ないし LTD に対して、NMDARs および AdoA1R 阻害薬の効果を検討した。



**図 3** (左) 1Hz の単発刺激を 40-1000 発シナプス入力した際に、standard solution 灌流 (control), 8-CPT (1  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M)投与した。単発刺激 60 分後の f-EPSP slope の変化を示す。(中) 0.5-10Hz の単発刺激を 1000 発シナプス入力した際に、standard solution 灌流 (control), 8-CPT (1  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M)投与した。単発刺激 60 分後の f-EPSP slope の変化。CA1 シナプス入力での LTD 誘導の閾値刺激は 1 Hz, 200 発である。(右) 閾値刺激で誘導した LTD に対する AdoA1R 阻害薬 (8-CPT, 1 $\mu$ M) NMDARs 阻害薬(AP5, 50 $\mu$ M), IP3Rs 阻害薬 (2-APB, 10 $\mu$ M) および GABA<sub>A</sub>R 作動薬(muscimol, 1 $\mu$ M)の薬理効果。 \*\* $P$ <0.01, student t-test。

### (3) 高周波数バーストと低周波数単発入力とを重ねて誘導した CA1 シナプス可塑性

HFS と LFS を重ね合わせてシナプス入力し誘導したシナプス可塑性誘導を検討し、相互の関係を明らかにした。HFS として 100 Hz , 4 pulse train 80 ないし 1000 trains を 1Hz ないし 5Hz でシナプス入力し、60 分間 f-EPSP slope ないし PS amplitude の変化を観察した。その際に AdoA1R 阻害薬 (8-CPT, 1 $\mu$ M) ないし IP3Rs 阻害薬 (2-APB, 10 $\mu$ M) を投与し効果を検討した。



**図 4** 100 Hz 4 pulses のバーストを 1 ないし 5Hz で 80 trains、および、1000 trains シナ

プス入力し、f-EPSP slope の変化を記録した。同シナプス入力時に standard solution 灌流 (control), 8-CPT(1  $\mu$ M), 2-APB(10  $\mu$ M)を投与し、60 分後の f-EPSP slope の変化を検討した (\*P<0.05. \*\*P<0.01, student t-test)。

以上(1)(2)(3)の実験結果から以下の結論が得られた。

海馬 CA1 シナプス可塑性において、AdoA1R 阻害薬 8-CPT は高周波数バースト刺激(HFS)による LTP 誘導(HFS-LTP)を促進した(図1)。HFS-LTP 誘導は興奮性シナプス前終末の AdoA1R 活性化により調節されると結論した(図1,2)。

その一方で、8-CPT は PPI を増強し(図2)、低周波単発入力刺激(LFS)での LTP 誘導(LFS-LTP)を阻害する一方で LFS-LTD 誘導を促進し(図3)、AdoA1R による介在ニューロンシナプス伝達調節の LFS による LTP/LTD 誘導への関与が示唆された(図2,3)。IP3R 阻害薬 2-APB は LFS-LTP 誘導には関与せず LFS-LTD 誘導を阻害したことから(図3)、LFS-LTD 誘導には NMDARs と IP3Rs がともに活性化される必要があると結論した。また、HFS と LFS が重畳してシナプス入力される場合も、興奮性シナプス後細胞内で IP3Rs 活性化による細胞内脱リン酸化現象が生じ、HFS-LTP 誘導が抑制されると同時に、LFS-LTD 誘導が生じたと結論した(図4)。

本研究では 1 Hz-LFS-LTD の性質を明らかにした(図3)。

1. NMDAR 阻害薬 AP5 濃度依存性に LTD から LTP に誘導が反転した。
2. IP3R 阻害薬 2-APB を与えると阻害された。
3. Muscimol で興奮性シナプス後ニューロンの GABA<sub>A</sub>Rs 抑制を増強すると LTD 誘導から LTP 誘導へ反転した。
4. 8-CPT は PPI を増強するとともに LTD 誘導を阻害した。

1HzLFS による LTD には、NMDARs と IP3Rs の co-activation が必要である(Fujii et al. Neurosci. 168, 346-358, 2010)。このうち、NMDARs の活性化は電位依存性でありシナプス後細胞の GABA<sub>A</sub>Rs の活性化が影響する。本研究結果より内因性 adenosine は、抑制性介在ニューロンのシナプス伝達を抑制することで、シナプス後細胞に対する GABA 抑制を軽減させて NMDARs の活性化を促進し、LTD 誘導を促進している可能性が示唆された。HFS-LTP 誘導は、興奮性シナプス前終末の AdoA1R の活性化に依存し、基本的には LFS-LTP ないし LFS-LTD 誘導メカニズムと独立したものであると考えられるが、低周波数入力が長時間持続して IP3Rs が活性化して細胞内脱リン酸化が進行する(Fujii et al. Neurosci. 168, 346-358, 2010; Fujii et al. Learning & Memory 27, 52-66, 2020; Goto et al. Learning & Memory 29, **110-119, 2022**) と、両者はともに抑制を受けるようになると推察される。上記考察内容を以下の表にまとめた。

**表 受容体活性化と HFS - LTP ないし LFS-LTD 誘導**

	HFS-LTP	LFS-LTD
NMDARs	↑	↑
mGluR-IP3Rs	—	↑
GABA <sub>A</sub> Rs	↓	↓
AdoR1	↓	↓

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 Satoshi Fujii, Yoshihiko Yamazaki, Junichi-Goto, Hiroki Fujiwara, Katsuhiko Mikoshiba	4. 巻 16
2. 論文標題 Depotentiatio depends on IP3 receptor activation sustained by synaptic inputs after LTP induction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Learning & Memory	6. 最初と最後の頁 52-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/lm.050344.119	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 Goto Jun-Ichi, Fujii Satoshi, Fujiwara Hiroki, Mikoshiba Katsuhiko, Yamazaki Yoshihiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein released with IP <sub>3</sub> (IRBIT)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Learning & Memory	6. 最初と最後の頁 110 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/lm.053542.121	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井聡
2. 発表標題 海馬CA1シナプス脱長期増強誘導のシナプス活動依存性
3. 学会等名 日本生理学会東北地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1)Goto JI, Fujii S, Kaneko K, Fujiwara H, Yamazaki Y, Mikoshiba K
2. 発表標題 Depotentiatio at the hippocampal CA1 synapse depends on the basal synaptic transmission
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies, Kobe (国際学会)
4. 発表年 2019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	後藤 純一  (Goto Junichi)  (70435650)	山形大学・医学部・助教    (11501)	

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
---------	---------