

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06890

研究課題名（和文）ペリニューロナルネットによる機能的なシナプス伝達モジュレーションの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms underlying perineuronal net-mediated functional modulation of synaptic transmission

研究代表者

廣野 守俊（Hirono, Moritoshi）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30318836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ペリニューロナルネット（PNN）はニューロンを包み込む網目状構造物であり、一生涯続くような記憶にはたらく。運動学習を担う小脳核ニューロンはPNNを構築し、そのコンドロイチン硫酸の硫酸化パターンは、抑制性シナプス伝達を制御する可能性が示唆された。また、慢性拘束ストレスは小脳核のPNNを増加したが、自発運動はその増加を抑制する傾向を示したことから、これらの刺激は小脳核のPNNを介して、相反する効果を運動学習の形成や維持に与えるものと示唆される。さらに、脳腸相関にかかわるグレリン関連分子は小脳核においてPNNと同様な発現パターンを示したことから、食事リズムと運動学習の関連性が推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶痕跡の研究は、単に記憶学習を知るだけではなく、外部環境への適応方式の理解や、精神疾患や脳障害の原因究明にもつながる。PNNは中枢神経系の細胞外マトリックスであり、記憶の痕跡に関与する。本研究結果は、PNNがシナプス結合を形態的に安定化するだけでなく、神経終末からの神経伝達物質放出を制御する可能性を示唆した。さらにPNNは、小脳核においてストレスや運動でダイナミックに変化し、運動学習効率に影響する可能性があることから、PNNの制御機構の解明は重要である。PNNを構築する他の脳部位に本研究結果を適用することにより、その部位依存的な精神疾患の原因究明や治療法開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Perineuronal nets (PNNs), composed of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), are the extracellular matrices that surround neuronal cell bodies and proximal dendrites. PNNs regulate neural plasticity by morphologically restricting production of new synapses and deletion of old synapses. Large glutamatergic neurons in the deep cerebellar nuclei (DCN) are enwrapped by PNNs. This study shows that sulfation patterns of CS could modulate differentially GABAergic transmission onto DCN neurons. Chronic restraint stress increased PNNs in the DCN, whereas voluntary wheel running appeared to reduce the enhancement. Thus, these alterations of PNN density in the DCN could modulate cerebellar motor learning. DCN neurons enwrapped by PNNs also express an orexigenic hormone ghrelin and its receptor GHS-R1a, suggesting that ghrelin signaling, which depends on dietary rhythms may regulate the PNN density. These results could also contribute to the elucidation of roles of PNNs in other brain areas.

研究分野：神経生理学

キーワード：グリコサミノグリカン コンドロイチン硫酸プロテオグリカン シナプス伝達 GABA 小脳核 慢性拘束ストレス 痛覚過敏 自発運動

1. 研究開始当初の背景

成熟した中枢神経系では、ペリニューロナルネット (perineuronal net: PNN) とよばれる細胞外マトリックスが、シナプスを構成する4つ目の因子として挙げられる。PNNは神経細胞の細胞体や近位の神経突起を包み込む網目状の構造物であり、主にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG)、ヒアルロン酸、リンクプロテイン、テネシシンから成り立つ。CSPGはコアタンパク質に長い直鎖状のコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖がついた糖タンパク質である。CSPGは神経再生の阻害因子であることから、脳梗塞や脊髄損傷の部位から如何にCSPGを取り除いて、神経突起伸長を促すかという点についてこれまで精力的に研究が進められてきた。一方、統合失調症のヒト前頭前野や海馬、自閉症様の脳では、PNN密度の低下が報告されていることから、PNNの形成異常は精神疾患と密接に関係すると推測される。これまでPNNは、シナプス前終末の新たな形成や刈り込みを形態的に制限し、記憶の固定化に寄与する構造物と考えられてきた。しかし一方で、シナプス伝達に対する機能的な修飾作用はほとんど分かっていない。

我々の先行研究では、PNNをコンドロイチナーゼABC (ChABC)を投与して急性に除去すると小脳プルキンエ細胞 (PC) 軸索終末からのGABA放出が促進されることが分かった (図1)

。このGABA放出促進には、PNN除去で生じるとされるシナプス周囲の細胞外Ca²⁺濃度上昇や、プレシナプスCa²⁺チャンネルコンダクタンスの増大に無関係であった。ゆえにPNNが機能的にGABA放出を制御する新たな機構がシナプス前終末に存在する可能性がある。神経軸索誘導の先行研究では、CS鎖やヘパラン硫酸 (HS) 鎖といったグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の受容体として、受容体型チロシンホスファターゼRPTP (PTP δ or PTP σ)が挙げられる。

CS鎖はホスファターゼ活性を亢進させ、神経終末内のチロシン残基の脱リン酸化を進めると考えられている。一方、HS鎖はRPTPのオリゴマー形成に寄与してホスファターゼ活性を阻害する。また、CS鎖の受容体候補としてNogo受容体が挙げられ、そのシグナル伝達下流ではRhoA/ROCKの活性化が導かれる。しかし、プルキンエ細胞-小脳核ニューロン間シナプスにおいて、GAG鎖がシナプス前膜の受容体に作用し、GABAシナプス伝達を如何に制御するのか不明である。

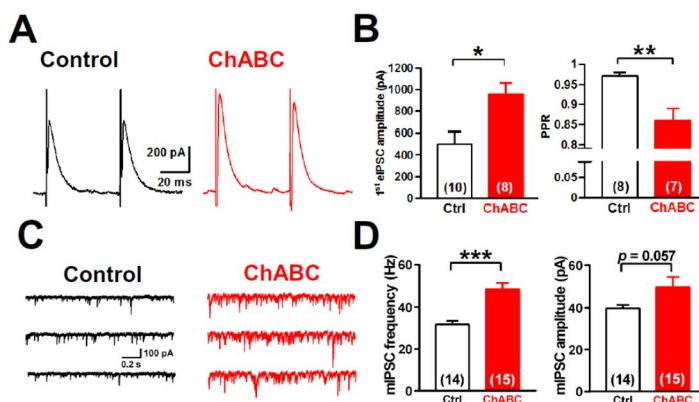


図1. 小脳核ニューロンの抑制性シナプス後電流 (IPSC)、PNNをコンドロイチナーゼABC (ChABC)で除去する。A: 誘発性IPSCの典型的な波形。B: 誘発性IPSCの振幅とpaired-pulse ratio (PPR)。C: 微小IPSCの典型的な波形。D: 微小IPSCの頻度と振幅。(を改変)

2. 研究の目的

本研究では、PNNがシナプス伝達を如何なる機能的なメカニズムでモジュレーションするのかを明らかにする。GAG鎖が作用する受容体を同定し、RhoA/ROCKの活性化の関与を検証しながら、シナプス伝達が如何に制御されるのかを解明することを目指したい。CS鎖やHS鎖によるGABA放出の修飾作用を、小脳核の抑制性GABAシナプス伝達を用いて解明する。さらに各GAG鎖の硫酸化パターンの作用について検討する。分解酵素によって急性にPNNを取り除くだけでなく、環境要因的にPNNを低形成するマウス小脳核ニューロンを用いて、シナプス伝達への影響を電気生理学的に明らかにする。また、従来、小脳核ニューロンへの2つの興奮性シナプス入力である登上线維と苔状線維を、刺激電極で区別して刺激することは困難であった。そこで各線維を別々に興奮させることを試みる。

3. 研究の方法

小脳において PNN を構築するニューロンの活動や PNN で囲まれるシナプス部位でのシナプス伝達を解析するため、2 - 4 週齢マウスから急性小脳切片を作製し、目的のニューロンへパッチクランプ法を適用し、電気応答を記録した。PNN や目的のタンパク質の発現は、免疫組織化学染色法により確認した。

(1) パッチクランプ法による電気応答の記録

マウス小脳切片中の小脳核ラージグルタミン酸作動性ニューロンにホールセル電位固定法を適用して、プルキンエ細胞の軸索を刺激電極で刺激し、誘発性の抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current: IPSC) を記録した。また他のニューロンの IPSC も同様に測定した。ニューロンの発火頻度は細胞内環境に影響を与えないセルアタッチド法により記録した。

(2) 慢性拘束ストレスの負荷と自発運動の方法

動物実験では、目的の脳部位から PNN を除去するために、CSPG 糖鎖の分解酵素である ChABC のインジェクションが用いられている。しかし、この方法は侵襲的であり、非選択的に糖鎖を分解するため ChABC の臨床応用は困難である。そこで代替方法として、PNN の密度低下を惹起すると推測される自発運動に着目した。またその対照として慢性拘束ストレスを負荷した。まず垂直型の慢性拘束ストレスは、2 ヶ月齢のマウスを 50 mL プラスチックチューブに入れ、それを垂直に立てて 1 日 6 時間拘束し、10 日間与えることにした。痛覚過敏を検証するため、後肢の機械的感覚閾値を von Frey test で調べたところ、閾値が有意に下がることが観察された。次にケージに回し車を置き、自発運動をさせると、低下した機械的感覚閾値が 4 週間後には元に戻ることが確認された。

(3) 免疫組織化学染色法

2 ヶ月齢のマウス、あるいは (2) で作製したマウスに灌流固定を施し、脳を取り出して薄切した。Wisteria floribunda agglutinin (WFA) レクチンを一晩投与し、この染色像により PNN の構築を検証した。また目的のタンパク質の抗体を同様に一晩投与し、その発現パターンを検証した。

4. 研究成果

(1) 硫酸化パターンとカンナビノイドによる小脳核ニューロンの抑制性シナプス伝達修飾

CS 鎖の硫酸化パターンは、脳の発生と発達に伴い、6 - 硫酸化 (6S) から 4 - 硫酸化 (4S) に変化することが報告されている。そこで、幼若マウスの小脳核ラージグルタミン酸作動性ニューロンへ CS-4S あるいは CS-6S を投与して、誘発性 IPSC への影響を検証した。その結果、CS-4S は誘発性 IPSC に影響しなかったものの、CS-6S 投与によって、誘発性 IPSC の振幅は有意に減少し、paired-pulse ratio (PPR) も増大する傾向がみられた (図 2)。CS-6S によって、プレシナプスからの GABA の放出確率が低下する可能性が推測される。しかし、この結果は予想とは逆の傾向であり、今後追試や考察が必要である。

また小脳において PNN を形成するニューロンへの抑制性シナプス伝達に対するカンナビノイドの感受性を調べたところ、これらのニューロンに投射するプルキンエ細胞の GABA 放出は、カンナビノイドの作用を受けないことが明らかとなった (Hirono and Yanagawa, 2021 J Neurosci Res)。

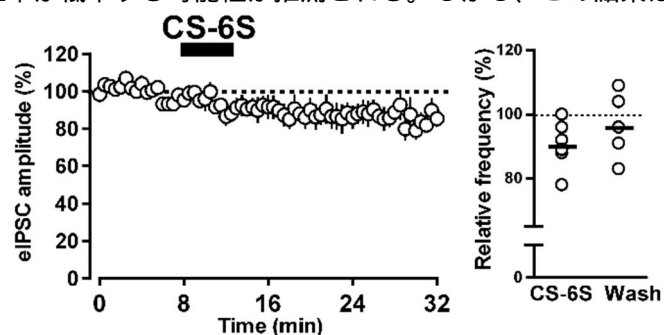


図 2. 小脳核ニューロンにおける誘発性 IPSC に対する CS-6S の作用。CS-6S (40 nM) を灌流投与すると振幅が減少する傾向が観察された。

(2) 小脳核ニューロンにおける PNN と消化管ホルモングレリンの共発現と電気生理学的解析
 マウス小脳核は、内側から外側に向けて、室頂核、中位核、歯状核の3つに分けられる。我々の WFA 染色により、その中でも中位核外側が強く染まる傾向が見られた (Hirono et al., 2021 Front Neural Circuits)。また脳腸相関を調べるため、消化管ホルモンであるグレリンと小脳との関係を検証した。グレリンとグレリン受容体 GHS-R1a に対するそれぞれの抗体を用いて小脳を免疫組織化学染色すると、プルキンエ細胞だけでなく、小脳核ニューロンも WFA 染色と同様に染まることが分かった。つまり、空腹時に分泌されるグレリンによって小脳核ニューロンの活動は影響を受け、それに伴い PNN の密度が変化する可能性が示唆された。しかし、どのように実際に調整されるのかは今後の検証が必要である。

(3) 小脳皮質におけるグレリンの作用の解析

我々の先行研究では、プルキンエ細胞へのシナプス入力にグレリンで修飾される可能性が示唆されていた。そこで、プルキンエ細胞への抑制性シナプス伝達に対するグレリン作用を検証したところ、自発性の IPSC が促進することが分かった。また、誘発性 IPSC や微小 IPSC が変化しないことから、抑制性シナプス伝達に直接影響するのではなく、分子層の抑制性介在ニューロンであるバスケット細胞や星状細胞の発火を促進することが明らかになった (Hirono and Nakata, 2023 Sci Rep)。一方、平行線維プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達はグレリンの影響を受けなかった。従って、グレリンはプルキンエ細胞の発火を直接的、間接的に制御する可能性が示唆された。

(4) 慢性拘束ストレスと自発運動による小脳核 WFA 染色の変化

我々の作製した慢性拘束ストレスマウスは、持続的な機械的感覚閾値の低下を示した。つまり、継続的な痛覚過敏を示した。さらに、回し車を与えて自発運動をさせると4週間後には機械的感覚閾値が回復し、痛覚過敏が緩和されることが分かった。これらのマウスで小脳中位核ニューロンの PNN 密度を WFA 染色で調べたところ、慢性拘束ストレスを負荷して自発運動させない群 (vCRS+sed) は、コントロール群に比べて、PNN の密度が有意に高くなった (図3)。一方、慢性拘束ストレスを負荷して自発運動をさせた群 (vCRS+VWR) は、コントロール群に比べて PNN の密度は上昇したままであったが、その上昇率は vCRS+sed に比べて低い傾向が見られた。したがって、我々の先行研究結果から、慢性拘束ストレス負荷によって小脳核ニューロンへのプルキンエ細胞からの

抑制性 GABA 入力が低下して、このニューロンが継続的に興奮しやすくなっていると推測される。また、苔状線維小脳核ニューロン間のシナプス可塑性が阻害される可能性が考えられる。ゆえに、慢性拘束ストレス負荷によって小脳運動学習が小脳核においては惹起されにくくなる可能性が示唆された。またこの運動学習効率の低下は、自発運動によって回復に向かう可能性が示唆された。

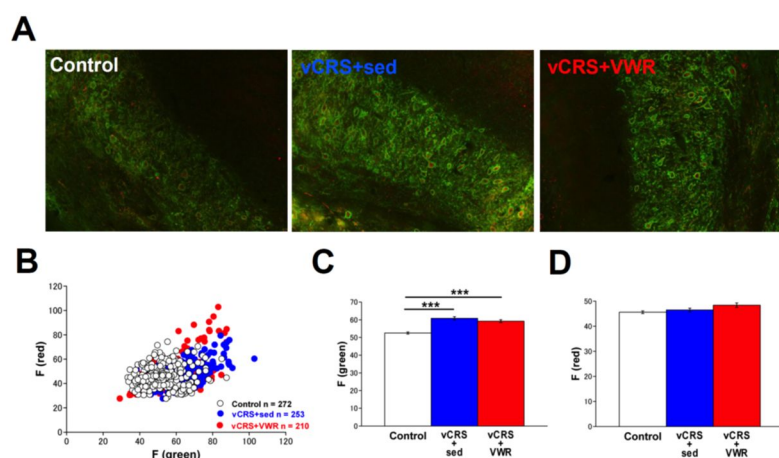


図3. 慢性拘束ストレス (vCRS) および自発運動 (VWR) が小脳中位核ニューロンの PNN 密度に及ぼす影響。A: vCRS により PNN の F(green)が上昇した。B: PNN(F(green))と SMI32(F(red))の相関関係。C: PNN 密度は vCRS で上昇し、その上昇は VWR で低下する傾向があった。D: 細胞体を認識する SMI32 の発現量は変化しなかった。

<引用文献>

Shen HH. Perineuronal nets gain prominence for their role in learning, memory, and plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115 (40):9813-9815, 2018.

Fawcett JW, Oohashi T, Pizzorusso T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci* 20:451-465, 2019.

Hirono M, Watanabe S, Karube F, Fujiyama F, Kawahara S, Nagao S, Yanagawa Y, Misonou H. Perineuronal nets in the deep cerebellar nuclei regulate GABAergic transmission and delay eyeblink conditioning. *J Neurosci* 38 (27):6130-6144, 2018.

Coles CH, Jones EY, Aricescu AR. Extracellular regulation of type IIa receptor protein tyrosine phosphatases: mechanistic insights from structural analyses. *Semin Cell Dev Biol* 37:98-107, 2015.

Dickendesher TL, Baldwin KT, Mironova YA, Koriyama Y, Raiker SJ, et al. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci* 15:703-712, 2012.

Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, Kitagawa H. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci* 15:414-422, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirono Moritoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Lugaro Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Essentials of cerebellum and cerebellar disorders. A primer for graduate students	6. 最初と最後の頁 177 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-031-15070-8_26	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 Moritoshi Hirono, Masanori Nakata	4. 巻 13
2. 論文標題 Ghrelin signaling in the cerebellar cortex enhances GABAergic transmission onto Purkinje cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29226-3	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 Hirono Moritoshi, Karube Fuyuki, Yanagawa Yuchio	4. 巻 15
2. 論文標題 Modulatory Effects of Monoamines and Perineuronal Nets on Output of Cerebellar Purkinje Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 661899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2021.661899	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 Hirono Moritoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Physiological Roles of Perineuronal Nets in Cerebellar Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebellum as a CNS Hub	6. 最初と最後の頁 169-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-75817-2_8	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 Moritoshi Hirono, Yuchio Yanagawa	4. 巻 99
2. 論文標題 Endocannabinoids regulate cerebellar GABAergic transmission in a synapse type dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 898 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24765	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 1件)

1. 発表者名 廣野守俊、張博洋、中田正範
2. 発表標題 小脳神経細胞のグレリン誘導性発火促進は栄養状態により変化する
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 廣野守俊、中田正範
2. 発表標題 小脳抑制性介在ニューロンに対するグレリンの興奮作用
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 M Hirono, Y Kishimoto, R Atarashi, S Sakaguchi, T Yoshioka, S Katamine, Y Kirino
2. 発表標題 Impairment of GABAergic transmission and long-term depression in the cerebellar cortex of prion protein deficient mice ectopically expressing PrPLP/Dpl
3. 学会等名 Virtual 2021 the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 廣野守俊、柳川右千夫
2. 発表標題 内因性カンナビノイドによる小脳GABAシナプス伝達のシナプスタイプ別制御
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 廣野守俊、柳川右千夫
2. 発表標題 小脳ブルキンエ細胞のGABA放出に対するカンナビノイドの作用解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣野守俊、御園生裕明	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Clinical Neuroscience Vol.37 (19年) 08月号 小脳学習説 Marr-Albus-Ito理論の50年 ニューロサイエンスの最新情報「小脳核におけるペリニューロナルネットの役割」	

〔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

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