

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年8月22日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650206

研究課題名（和文） カンナビノイドによる軸索投射刈り込みの可能性の検討

研究課題名（英文） Examination of the possibility of cannabinoid-dependent pruning

研究代表者

木村 文隆 (Kimura Fumitaka)

大阪大学・大学院・医学系研究科・准教授

研究者番号：00202044

研究成果の概要（和文）：大麻の有効成分であるカンナビノイドは、逆行性の神経伝達物質として注目を受けたが、近年では、感覚皮質におけるスパイクタイミング依存性可塑性の長期抑圧を導く伝達物質として再度注目されている。一方、長期抑圧が誘導されると、入力線維はしばしば刈り込まれることが知られている。このことは、カンナビノイド投与単独でも入力線維の刈り込みがおこる可能性を示している。我々は、視床-皮質投射において、発達期にカンナビノイド受容体依存性の長期抑圧が起こることを見出した。視床-皮質投射の変化を調べたところ、長期抑圧が起こっている時期に一致して軸索の退縮が起こることも見出した。外因性にカンナビノイドを投与することによって退縮が起こるかは現在検討中である。

研究成果の概要（英文）：Cannabinoids (CBs) first received much interest as its unconventional, characteristic action as a retrograde neurotransmitter. CB also draws much attention because it causes LTD of spike timing-dependent plasticity (STDP). Once LTD is induced, afferents are often pruned. This raises a possibility that cannabinoid agonist itself causes afferent pruning. We found thalamocortical projection exhibits CB receptor (CBR)-dependent long-term depression, which shows spike timing dependence, thus a form of STDP during development. We also found that thalamocortical projection shows a retraction during the period when STDP-LTD is inducible. We are currently studying if exogenous application of CB agonists induces afferent retraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：発達・可塑性・薬物依存・回路形成

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質体性感覚野は、発達の一時期に入力に依存してシナプス結合を変化させる可塑性を示すことが知られ、これは学習、記憶の基礎過程とメカニズムを共有していると考えられている。この可塑性の発現には、4層-2/3層間のシナプスが重要な役割を果たすと考えられていたが、どのようなメカニ-

ムで可塑的な時期（臨界期）が始まるのかは不明であった。4層-2/3層間シナプスは可塑性の大きさと方向がシナプス前細胞と後細胞の発火タイミングに依存する、スパイクタイミング依存性可塑性（STDP）を示すが、我々は臨界期が始まる時期と同時にSTDPの性質が大きく変化することを見出し、これが臨界期開始を導くことを見出した。このSTDPは2/3層-4層順の発火で長期

抑圧 (LTD) となり、このLTDはカンナビノイド (CB) 依存性であることが知られている。すなわち、CB感受性を獲得することが臨界期の開始であり、生後12-14日におこる。一方、生後7-14日には2/3層へは視床からの直接の投射があり、このシナプスはCB依存性の、LTDだけのSTDPを示す可能性を見出した。従って、生後2週目(7-14日)には、視床-2/3層投射が、また生後3週目には4層-2/3層投射がCB依存性の可塑性を示すことになる。

## 2. 研究の目的

従来から、臨界期に感覚入力を除去すると、まずLTDが誘発され、次にその投射が刈り込まれていく可能性が指摘されている。体性感覚野ではLTDがCB依存性であることを考えると、CB投与だけで投射刈り込みが誘導できる可能性がある。すなわち、ここでは生後2週目には視床-2/3層投射がCB依存的に退縮し、3週目には4層-2/3層投射にCB依存的に退縮が起こる可能性が考えられる。本研究はこれらを検討することを目的とし、まず、視床-2/3層への可塑性の性質を正確に同定し、次に4層入力と、2/3層入力による相互競合作用を調べ、CB投与だけでも退縮が起こるかを調べるための基礎的なデータを収集する。

## 3. 研究の方法

### 1) STDP曲線の作成

生後2週 (生後7-14日) のマウスから視床とその投射先である大脳皮質の線維連絡を保持した切片標本を作製する。視床に刺激電極を静置し、バレル皮質2/3層の錐体細胞からガラス管電極を用いてホールセル記録を行い、細胞内電位を記録し、視床刺激による興奮性シナプス電位 (EPSP) を記録する。ここで、視床刺激によるEPSPと、電流注入による活動電位発生の時間について、ある一定の時間差を設定し、その条件で90回のペアリング刺激を7秒間隔で行い (タイミング刺激)、その後のEPSPの変化を観察する。タイミング刺激に用いる時間差を±200ms内で様々な値に設定し、それぞれの条件下で得られたLTP, LTDをもちいてSTDP曲線を作成する。

### 2) カンナビノイド感受性テスト

1) と同一の標本、刺激、記録法を用いて、視床-2/3層投射における、カンナビノイドアゴニストに対する感受性をテストする。

3) 視床に加えて4層にも刺激電極をおき、視床-2/3層シナプスのLTDが4層-2/3層のLTPを誘導するかを調べる。

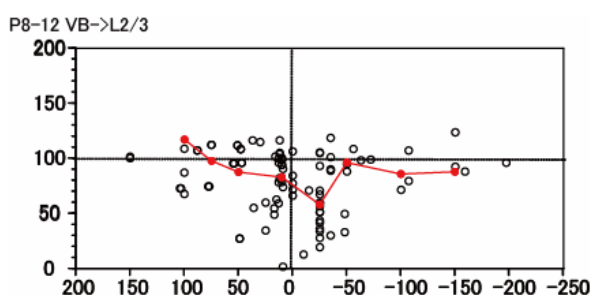
### 4) 視床-皮質投射の形態学的解析

視床-皮質投射が生後2週目に、特に2/3層、4層において形態学的に投射が変化するかどうかを検討する。実験は、視床細胞のみGFPを発現した遺伝子改変マウスを用いて検討する。

## 4. 研究成果

1) 生後2週のマウスからえられた、視床-2/3層錐体細胞間シナプスにおけるSTDP曲線は以下ようになった (図1)。

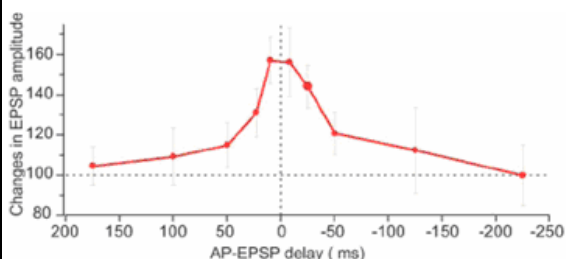
図1



(図の説明) 視床-2/3層に種々のタイミング刺激を与えてできたSTDP曲線。横軸は視床-2/3層間に与えたタイミング刺激の時間差 (+は視床→2/3層順、-は逆順) 縦軸はその結果得られたLTP (>100%) とLTD (<100%)。

この時期、4層-2/3層間では、4層→2/3層順でも、2/3層→4層順でもLTPが導かれる (図2)

図2



(図の説明) 4層-2/3層間のSTDP曲線横軸と縦軸は図1と同じ

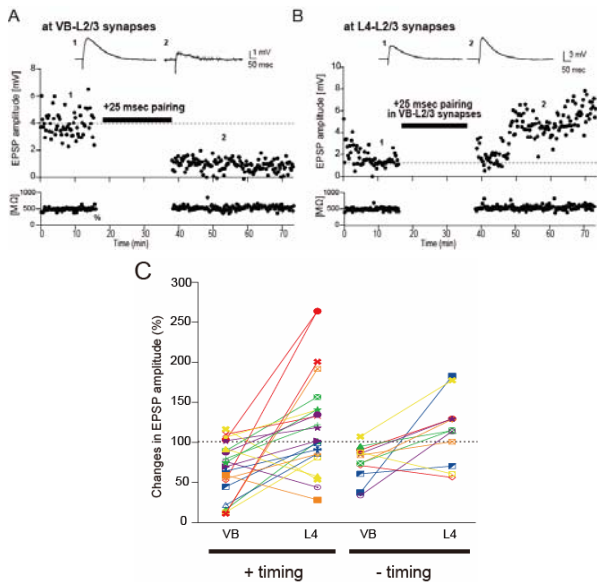
従って、2/3層へは、4層からと、視床からと、ちょうど逆向きのSTDPが集束していることになる。

2) 視床-2/3層投射において、カンナビノイドアゴニストの感受性をWINを用いて行った。その結果、WINは視床由来のEPSPを約70%に抑制した。また、この抑制作用はカンナビノイド拮抗薬のAM251でブロックされた。

3) 視床-2/3層シナプスと4層-2/3層シナプスの協調作用

視床-2/3層シナプスにおいて、視床→2/3層タイミング刺激を与えてLTDを誘発すると、タイミング刺激を与えていなくてもかかわらず、4層-2/3層シナプスにおいてLTPが誘発された。また、視床-2/3層間に逆タイミングのペアリングを与えて、LTDを誘発しても、4層-2/3層間はLTPが誘発された。(図3)

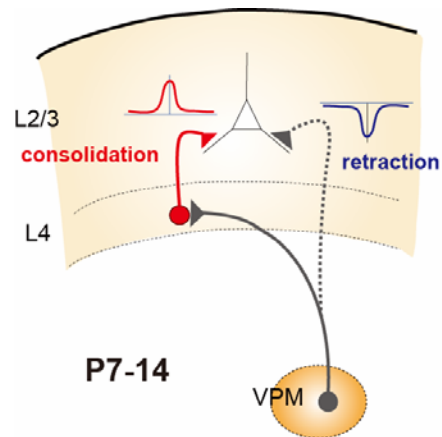
図3



(図の説明) 視床-2/3層へ逆タイミング刺激を与えるとLTDが誘発される(B)が、この時4層-2/3層シナプスでは、刺激を与えていないにもかかわらずLTPが誘発された(A) Cのグラフにその結果を纏めた。

これらの結果は、視床の活動は、視床-2/3層への投射を抑圧しながらも、4層-2/3層のシナプスを強化していることを示していると考えられる。以上の結果を模式的に示した(図4)

図4



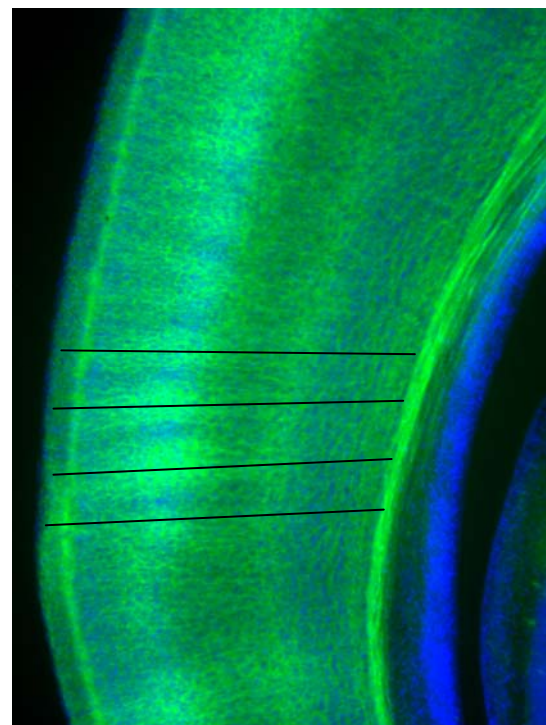
(図の説明) VPM(視床)は4層、2/3層に投射しているが、視床の活動は両者に興奮を与えるため、4層-2/3層シナプスを強化し、視床-2/3層投射を抑圧する。

4) 視床-皮質投射の形態学的解析

視床細胞にのみGFPを発現させた遺伝子改変マウスを用いて、視床終末の形態的变化を生後2週齢で観察した。その結果、生後7日目では、視床線維は2/3層内に多く進入しているものの、生後12日目では2/3層下部までにはしか進入していなかった。これは、2/3層支配が活動依存的に、視床から4層へと置きかえられた結果だと考えられる。(図5)

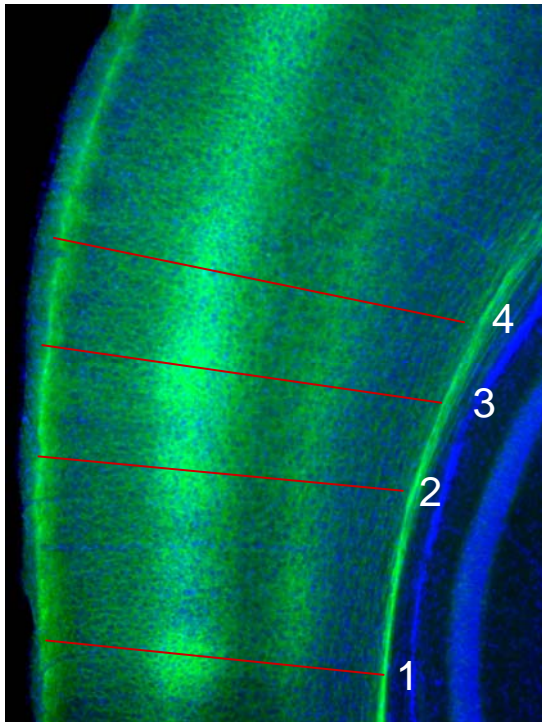
図5

A



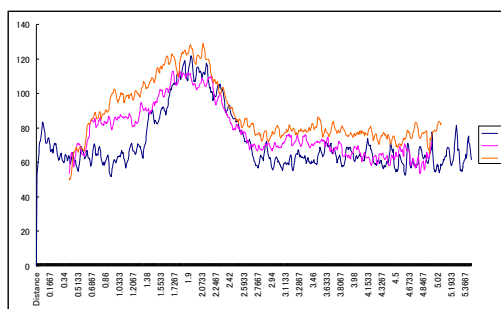
生後7日の体性感覚皮質の蛍光画像。左が脳表面。4本の直線に沿って、蛍光強度を計測した結果をCに示す。

B



生後12日の体性感覚皮質の蛍光画像。左が脳表面。4本の直線に沿って、蛍光強度を計測した結果をCに示す。

C



生後7日（ピンク、オレンジ）と生後12日（青）の視床線維の分布。横軸は脳表面からのきょり。中央の山はバレル（4層）を示す。生後7日では2/3層に多くの分布が見られるが、12日にはほぼ消失している。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計3件）

(1) Itami, C. and Kimura F. Developmental switch in spike timing-dependent plasticity at L4-L2/3 in the rodent barrel cortex *Journal of Neuroscience* 査読有り 32 (2012) 15000-15011, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2506-12.2012

(2) Ikezoe, K. Tamura, H. Kimura, F. Fujita, I. Decorrelation of sensory-evoked neuronal responses in rat barrel cortex during postnatal development *Neuroscience Research* 査読有り 73 (2012) 312-320 DOI: 10.1016/j.neures.2012.05.009

〔学会発表〕（計8件）

(1) 木村文隆 発達期バレル皮質2/3層錐体細胞への異なるスパイクタイミング依存性可塑性とその相互作用 第35回日本神経科学大会 2012年9月18～21日 名古屋

(2) Itami, C. Cooperative heterosynaptic interaction of spike timing-dependent plasticity in the developing barrel cortex 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience 2012年10月13日～17日 New Orleans, 米国

(3) Kimura, F. Two distinct STDPs converging onto layer 2/3 pyramidal neurons during the 2nd postnatal week in the rodent barrel cortex. 8th FENS Forum 2012年7月14～18日 Barcelona, スペイン

(4) Kimura, F. Developmental switch in the spike timing-dependent plasticity at layer 4 to layer 2/3 synapses in coincident with the initiation of critical period in the mouse barrel cortex. 8th IBRO World Congress of Neuroscience 2011年7月18日 Firenze, Italy

〔図書〕（計2件）

(1) 木村文隆 南山堂 「医学のための生命科学」(米田悦啓、岡村康司、金井良克、西田幸二編) (分担) 2013年発行予定

(2) 木村文隆 岩波書店 「生物学辞典」(巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚谷裕一編) 分担 2013年 2192頁

〔その他〕



ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/kimura%20gyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 文隆 (Kimura Fumitaka)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00202044

(2) 研究分担者

伊丹 千晶 (Itami Chiaki)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90392430

(3) 研究協力者

Hui-Chen Lu  
ベイラー医科大学・准教授

J-Y Huang  
ベイラー医科大学・ポスドク研究員