

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500434

研究課題名(和文)海馬シナプス可塑性誘導の入力周波数依存性と内因性アデノシン関与に関する研究

研究課題名(英文)The effects of endogenous adenosine on hippocampal synaptic plasticity induced by low-frequency stimulation

研究代表者

藤井 聡 (Fujii, Satoshi)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海馬CA1シナプス可塑性誘導への内因性adenosine関与について以下の結論を得た。
 (1) adenosine A1受容体を介して抑制性介在ニューロンを抑制する。(2)興奮性シナプ스에서神経伝達物質の放出を抑制する。(3)高頻度バースト刺激時には、CA1錐体細胞の脱分極を促進してLTP誘導を促進する。(4)1Hz刺激では発数に応じてLTPとLTDが誘導される。LTP誘導にはNMDA受容体とA1受容体が関与し、LTD誘導にはNMDA受容体、IP3受容体、A1受容体が関与する。(5)5-10Hzの入力刺激でLTPが誘導され、NMDA受容体、PKC、A1受容体が関与する。

研究成果の概要(英文)：We studied the effects of adenosine A1 receptors (ADOA1Rs) on the synaptic plasticity in CA1 neurons. In the presence of 100 nM adenosine, we found that a tonic inhibition of interneurons for CA1 pyramidal neurons was decreased. Both potentiation and depression of the synaptic response were induced in CA1 neurons by systematically varying the frequency of low frequency afferent stimulation (LFS) between 1-10 Hz and the pulse number between 40-1000. A pharmacological study indicated that, despite their opposite effects, both the synaptic depression induced by LFS at 1 Hz and the synaptic potentiation induced by LFS at 10 Hz were triggered by co-activation of NMDARs, mGluRs and ADOA1Rs at CA1 synapses. We suggest that activation of ADOA1Rs in inhibitory interneurons suppresses the tonic inhibition for CA1 pyramidal neurons, facilitates NMDARs activation during LFS and triggers the mechanism for the bidirectional synaptic plasticity induced in CA1 neurons by 1-10 Hz LFS.

研究分野：神経生理学

キーワード：adenosine synaptic plasticity LTP LTD hippocampus NMDA receptors adenosine A1 receptors frequency

1. 研究開始当初の背景

本研究での研究代表者(報告者)および研究分担者は、これまで、海馬 CA1 ニューロンに 1-10 Hz の低周波数刺激で誘導するシナプス可塑性 (Long-term potentiation, LTP ; Long-term depression, LTD)の方向が、入力刺激時間と刺激周波数に依存することを明らかにしてきた(Fujii et al. Neurosci., 2010)。即ち、CA1 シナプスを 1Hz で刺激した場合、刺激時間が 2 分以内の場合は LTP が、3 分を超えると LTD が誘導された。5-10Hz で 1-3 分間刺激した場合は LTP が誘導されたが、入力時間に依存して LTP の振幅が縮小した。報告者らの上記研究結果の概略を、以下、(1)-(3) にまとめる。

- (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、バースト刺激で誘導した LTP はいずれも、シナプス後細胞の NMDA 受容体 (NMDARs) と代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) の co-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では、入力周波数に応じて mGluRs 活性化が引き起こすカスケード (IP3 受容体ないし protein kinase C) を使い分けている。1Hz で長時間シナプス入力すると、IP3 受容体 (IP3Rs) が活性化し、5-10Hz でシナプス入力すると protein kinase C (PKC) が活性化する。これらは NMDARs の活性化と共役し、LTD および LTP が誘導される (Fujii et al. Neurosci. 2010)。
- (3) 高頻度バーストで誘導する LTP には、抑制性ニューロンの IP3Rs 活性化が関与する。抑制性ニューロンで IP3Rs が活性化していると、バースト中に周囲への興奮性ニューロンへの抑制が増強する。結果として、興奮性ニューロンで脱分極と NMDARs 活性化が阻害され、LTP 誘導が妨げられる。

報告者らはこれまで、海馬 CA1 領域での LTP および LTD 誘導に、adenosine に対し高親和性の A1 受容体および低親和性の A2 受容体が関与することを明らかにした (Fujii et al. Eur. J. Pharmacol. 1997, J. Physiol. 1999)。しかし、バースト入力や低周波数入力で誘導するシナプス可塑性メカニズムへの adenosine 関与の詳細は不明で、検討を要していた。

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、「シナプス入力の周波数がどのように弁別されて、シナプス伝達効率の増減に変換されるか」の解明である。とくに、内因性 adenosine が抑制性ニューロンの興奮や興奮性ニューロンの脱分極を修飾する点に着目し、これがシナプス可塑性誘導の周波数弁別メカニズムに関与すること、を検証した。

3. 研究の方法

ラット・マウス海馬スライス標本(厚さ 500 μm) を作製し、CA1 領域への興奮性入力線維束に金属製電極で刺激を与えた。近赤外線微分干渉顕微鏡直視下に、錐体細胞にガラス電極を刺入れてホールセル記録を行った。また、錐体細胞層および放線層にガラス電極を留置して細胞外記録をおこない、集合電位 population spike および集合 EPSP を導出した。

集合 EPSP の初期の傾き (S-EPSP) および集合電位の波高値 (amplitude of population spike, A-PS) を計測し、その変化をシナプス伝達効率の変化とした。刺激強度は、S-EPSP が刺激応答曲線上で 40 - 60% になるように固定した。0.05Hz のテスト刺激を与えて応答の安定を確認した後、同じ CA1 領域への興奮性入力線維束に高頻度入力刺激 (high-frequency stimulation, HFS) ないし低頻度入力刺激 (low-frequency stimulation, LFS) を与え、再び 0.05Hz のテスト刺激に戻した後 60 分間、応答の変化を検討した。

10-35 msec の間隔で 2 発刺激を CA1 シナプスへの入力経路を刺激し、集合電位で 2 発応答を導出した。刺激 1 発目に対する A-PS に対する 2 発目 A-PS の減少および増大 (paired-pulse inhibition, PPI および paired-pulse facilitation, PPF) を記録して、これらの変化を抑制性介在ニューロン活動および transmitter release の変化とした。統計学的検討は、two-tailed Student's t-test を用い、($P < 0.05$ ないし 0.01) で有意とした。

4. 研究成果

抑制性ニューロン応答とバースト入力によるシナプス可塑性の関連についての解析

(1) 内因性 adenosine による抑制性介在ニューロン機能の制御の解析

CA1 領域への興奮性入力線維束に 10-35 msec 間隔で 2 発刺激して PPI および PPF を導出した (図 1)。刺激間隔 10 msec で導出された PPI は、adenosine 0.1 μM 灌流下により有意 (** $P < 0.01$) に減少する一方で、GABA_A 受容体 agonist・muscimol 1.0 μM 灌流下では有意 (* $P < 0.05$) に増大した。Adenosine A1 受容体 agonist・cyclopentyl adenosine (CPA) 10 nM 灌流下でも PPI は有意 (* $P < 0.05$) に小さい (data not shown)。従って、抑制性介在ニューロン・シナプスの活動は adenosine A1 受容体の活性化で減弱する、と結論した。

刺激間隔が 30-35 msec で導出された PPF は muscimol 1.0 μM 灌流下と standard solution 灌流下とで有意差がなかったが、adenosine 0.1 μM 灌流下では有意に増大した。また、CPA 10 nM の灌流でも PPF は有意に増大した (data not shown)。海馬 CA1 領域の興

興奮性シナプス伝達において、シナプス前からの transmitter release は adenosine A1 受容体活性化で減少する、と結論した。

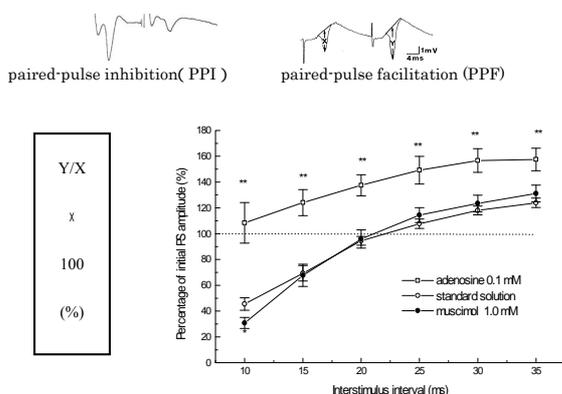


図1 10-35msecの間隔の2発刺激(PPF)により導出した応答(上段)。adenosine 0.1 μ M および muscimol 1.0 μ M 灌流下での PPI および PPF の変化(下段)。グラフ(縦軸は Y/X x100(%)を表わし、横軸は 2 発刺激の間隔(msec)を表す。Y/X x 100 100(%)ならば PPI の誘導を、100(%)ならば PPF の誘導を表す。**P < 0.01 ないし *P < 0.05, two-tailed student's t-test.

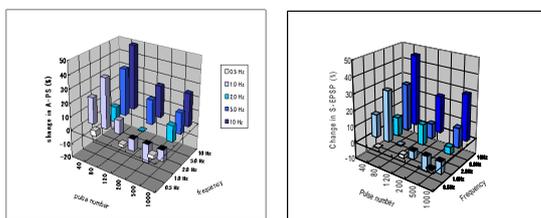


図2 CA1 シナプス入力経路に LFS 0.5-10Hz, 40-1000 発電気刺激し、その 60 分後に計測した S-EPSP (左) および A-PS (右) 各々 4 - 6 例ずつの平均値。縦軸 (X 軸) は S-EPSP ないし A-PS の変化 (%)、横軸 (Y 軸) は刺激発数 (pulse number)、横軸 (Z 軸) は入力周波数(frequency)を表す。

(2) 高頻度バースト刺激による LTP 誘導に対するアデノシン制御

100Hz のバースト刺激数を 10 発ないし 15 発として CA1 シナプスに入力すると、15 発では LTP が誘導され、10 発では LTP が誘導されなかったことから、15 発を閾値上刺激、10 発を閾値下刺激とした。adenosine 0.1 μ M 灌流下に閾値下バースト刺激を与えると LTP が誘導されたが、adenosine の灌流自体はシナプス伝達に影響を与えなかった。抑制性介在ニューロン・シナプスの A1 受容体が活性化して CA1 錐体細胞への抑制が减弱したために、閾値下のバースト刺激でもシナプス後細胞が十分に脱分極して LTP が誘導されたと考えられた。

低周波数シナプス入力に対する興奮性シナプス可塑性への adenosine 関与の解析

1-10 Hz の低周波数刺激(LFS)を CA1 シナプスに入力する際、興奮性シナプス間隙に蓄積する adenosine 濃度はシナプス入力周波数およ

び時間に依りて変化し、これが A1 ないし A2 受容体を介してシナプス可塑性メカニズムへ関与すると予想された。標準溶液灌流で入力する LFS の周波数を 1Hz とすると LTD は 200-1000 発で誘導され、周波数を 5 ないし 10Hz とすると 80-1000 発で誘導された(図2)。

そこで、1-10 Hz, 1000 発の LFS 入力時に adenosine A1 受容体阻害薬 8-cyclopentyltheophylline (8-CPT) 1 μ M ないし A2 受容体阻害薬 CP-66713 10 μ M 灌流し 60 分後に S-EPSP を計測した。LFS が 5Hz で誘導される LTP および 1 Hz で誘導される LTD は、8-CPT 灌流により各々 LTD および LTP に逆転して誘導された(図3)。一方で、CP-66713 灌流による有意な効果は認められなかった(図3)。

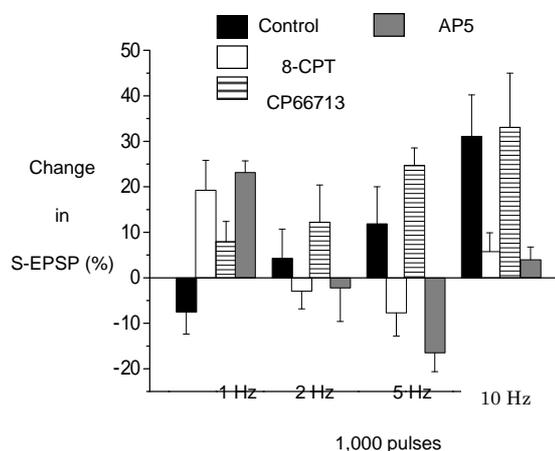


図3 1-10 Hz, 1000発のLFS入力時に8-CPT 1 μ M、CP-66713 10 μ MないしAP5 50 μ Mを灌流し、60分後にS-EPSPを計測した。各6-10例におけるmean \pm S.E.M.を表す。**P<0.01。

1-10 Hz の LFS で誘導される LTP ないし LTD が NMDA 受容体に依存している(Fujii et al. Neurosci. 12010)。海馬 CA1 シナプス後細胞の NMDARs 活性化で細胞外 adenosine 濃度が上昇し、シナプス前細胞の adenosine A1 受容体を活性化してグルタミン酸放出を抑制する、と報告されている(Manzoni et al., Science, 1994)。従って、LFS による LTP 誘導ないし LTD 誘導に、adenosine A1 受容体活性化を介したグルタミン酸放出が関与した可能性がある。

LFS周波数を1Hzに固定して入力した場合、短時間刺激(80発、1分20秒)ではLTPが誘導され、長時間刺激(1000発、16分40秒)ではLTDが誘導されているが、LTPおよびLTD誘導の両者ともにNMDARsおよびadenosine A1受容体が関与することが示された(図4)。これは、長時間刺激時に内因性adenosineはグルタミン酸放出を抑制してmGluRs/IP3Rs活性化を阻害し、LTD誘導を抑制しつつLTP誘導を促進する可能性を示唆する。

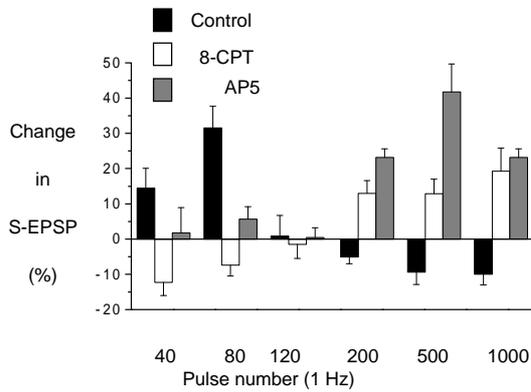


図4 LFSを1Hzに固定し、刺激発数を40-1000発に変化させて入力した。LFS入力時に8-CPT 1 μ M ないしAP5 50 μ Mを灌流し、60分後にS-EPSPを計測した。各6-10例におけるmean \pm S.E.M.を表す。

海馬CA1領域での内因性adenosineの作用として、本研究では以下の結果を得た。

- (1) 抑制性介在ニューロンを抑制することで興奮性ニューロン活動を調節する(図1)。
- (2) 興奮性シナプス伝達ではシナプス前よりの神経伝達物質の放出を抑制する(図1)。
- (3) 高頻度バースト刺激時にはA1受容体を介して抑制性介在ニューロン活動を抑制し、CA1錐体細胞の脱分極を促進することでLTP誘導を促進する可能性がある。
- (4) CA1シナプスに1Hzで入力すると、刺激発数に応じてLTPとLTDが誘導される(図2)。LTP誘導にはNMDARs, adenosineA1受容体が関与する(図3,4)。LTD誘導にはNMDARs, IP3Rs, adenosineA1受容体が関与する(図3,4)。CA1シナプスに5-10Hzの入力刺激を与えた場合はLTPが誘導される。LTP誘導にはNMDARs, PKCとともにadenosineA1受容体が関与する。

海馬CA1領域においてadenosine A1受容体は高いレベルで存在する (Fastbom et al., 1987)。内因性adenosine はA1受容体を介してシナプス前ニューロンからのグルタミン酸放出を低下させてシナプス後細胞でEPSPを抑制し、また、興奮性シナプス後ニューロンのK⁺チャネルに作動して脱分極を抑制する(Schbert and Mitzdorf 1979, Dunwiddie and Fredholm 1989)。さらに、内因性adenosine はA1受容体を介して抑制性介在ニューロン活動を抑制して、興奮性シナプス後ニューロンの脱分極を促進することが報告されている (Lee and Schubert 1982, Li and Henry, 2000,)。

海馬CA1シナプスでのLTP誘導では、シナプス後細胞のNMDARsの活性化と細胞内へのCa²⁺流入がLTP誘導に必要な細胞内2次情報伝達系活性化の引き金となる(Alford et

al., 1993 ; Bliss and Collingridge,1993)。

100HzのHFSおよび5-10HzのLFS刺激入力によるLTP誘導には抑制性ニューロン活動が深く関与し、内因性 adenosineはA1受容体を介して抑制性ニューロンによる興奮性シナプス後ニューロンの抑制を減弱させたものと考えられる。HFSおよびLFS入力時にinhibitory toneが減弱して、シナプス後細胞の十分な脱分極とNMDARsの活性化が得られ、LTPが誘導されたと考えられる。

1 Hz・40-80発のLFS入力で誘導されるLTDには、NMDARsの活性化に加えて IP3Rsの活性化が関与している。1 Hzでは長時間の入力刺激でIP3Rsが活性化してLTDが誘導する(Fujii et al., 2010)。海馬CA1シナプスに誘導されるLTDにおいてもシナプス後細胞のNMDARsの活性化と細胞内へのCa²⁺流入がLTD誘導に関わる細胞内2次情報伝達系活性化をトリガーする(Mulkey et al., 1994)。内因性adenosineはLTD誘導においてNMDARsの活性化を通じてそのメカニズムに関与していると考えられる。

報告者らは海馬CA1ニューロンにおいて、astrogliaが内因性adenosineの細胞外濃度を制御することで、ニューロン・シナプス可塑性誘導に関与していること報告した (Lee et al., 2013, Fujii et al., 2014)。本研究結果は、Glia細胞が内因性adenosine濃度を調節しながら、シナプス伝達およびシナプス可塑性誘導に関与するという研究結果と併せ、内因性adenosineがシナプス回路形成に重要な意義を持つものと思われる。

本研究の学術的な特色として、「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」可能性の検討があげられる。脳においてネットワーク全体としては低周波数で同期して興奮しつつ、ニューロン個々は高周波数でバースト発火している。ネットワークを形成するニューロンのシナプスには、高周波バーストと持続的な低周波入力が混在しながらシナプス可塑性が誘導され、これが「記憶情報」として蓄積される。

海馬シナプス可塑性は、記憶と学習の細胞レベルでの基礎過程として考えられている。「記憶が事象を認知した時点の意識水準に左右される性質」が、「シナプス可塑性の程度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」に基礎を置くとすれば、「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新たなメカニズム」を解明することは、実際の記憶や学習のメカニズムを解明するうえで重要であるといえる。

< 引用文献 >

Alford, S., Frenguelli, B. G., Schofield, J. G.,

Collingridge, G. L., 1993. Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurons by the synaptic activation of NMDA receptors. *J. Physiol.* 469, 693-716.

Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Dunwiddie, T.V., Fredholm, B.B., 1989. Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 31-37.

Fastbom, J., Pazos, A., Palacios, J.M. 1987. The distribution of adenosine A1-receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neurosci.* 22, 813-826

Fujii, S., Yamazaki, Y., Kuroda, Y., Mikoshiba, K., 2010. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the bidirectional synaptic plasticity induced in hippocampal CA1 neurons by 1–10 Hz low-frequency stimulation. *Neurosci.* 168, 346-358.

Fujii, S., Tanaka, K. F., Ikenaka, K., Yamazaki, Y., 2014. Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotential) in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 1578, 1-13.

Lee, H.-U., Yamazaki, Y., Tanaka, K., Furuya, K., Sokabe, M., Hida, H., Takao, K., Miyakawa, T., Fujii, S., Ikenaka, K., 2013. Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61, 210-224.

Lee, K., Schubert, P., 1982. Modulation of an inhibitory circuit by adenosine and AMP in the hippocampus. *Brain Res.* 246, 311-314.

Li, H., Henry, J. L., 2000. Adenosine action on interneurons and synaptic transmission onto interneurons in rat hippocampus in vivo. *Eur. J. pharmacol.*, 407,237-244.

Manzoni, O. J., Manabe, T., Nicoll, R. A., 1994. Release of Adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265, 2098-2101.

Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikars, S., Malenka, R. C., 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369, 486-488.

Schubert, P., Mitzdorf, U. 1979. Analysis and quantitative evaluation of the depressive effect of adenosine on evoked potentials in hippocampal slices. *Brain Res.* 172, 186-190.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yamazaki, Y. and Fujii S. Extracellular ATP modulates synaptic plasticity induced by activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *Biomedical Res.* 36 8(2015) 1-9 (査読有).

Yoshihiko Yamazaki, Hiroki Fujiwara, Kenya Kaneko, Yasukazu Hozumi, Ming Xu, Kazuhiro Ikenaka, Satoshi Fujii, Kenji F. Tanaka. Short- and long-term functional plasticity of white matter induced by oligodendrocyte depolarization in the hippocampus. *Glia*62(2014):1299-312 (査読有).

Fujii S., Tanaka KF, Ikenaka K, Yamazaki Y. Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotential) in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 1578 (2014) 1-13 (査読有).

Lee HU, Yamazaki Y., Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S., Ikenaka K., Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61 (2013) 210-224 (査読有).

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 聡 (FUJII, Satoshi)

山形大学医学部教授

研究者番号 : 80173384

(2)研究分担者

山崎 良彦 (YAMAZAKI, Yoshihiko)

山形大学医学部准教授

研究者番号 : 10361247