

Physiological roles of plasticity of inhibitory synaptic transmission

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-02-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Shosaku, Takako メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00056871

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



抑制性シナプス伝達の可塑性の生理的意義

(研究課題番号 13680899)

平成13年度～14年度 科学研究費補助金 (基盤研究 C₂)
研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 少作隆子

(金沢大学大学院 医学系研究科 シナプス発達・機能学)助教授

金沢大学附属図書館



0300-02192-5

目次

1. はしがき	-----	1
2. 研究組織・研究発表	-----	2
3. 研究成果		
(1) 研究の背景	-----	4
(2) 研究目的	-----	4
(3) 研究方法	-----	4
(4) 研究結果	-----	6
(5) 今後の展開	-----	20
4. 添付抄録（学会発表）		
(1) 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 発表演題抄録・演題英文抄録	-----	22
(2) 第79回日本生理学会大会 発表演題抄録・演題英文抄録	-----	23
(3) 第25回日本神経科学大会 発表演題英文抄録	-----	24
(4) 第80回日本生理学会大会・第76回日本薬理学会年会 発表演題英文抄録	-----	25
(5) 第80回日本生理学会大会・第76回日本薬理学会年会 発表演題英文抄録	-----	26
5. 添付論文（発表論文）		
(1) Eur J Neuroscience 15 (2002) 953-961	-----	27
(2) J Neurosci (2002) 3864-3872	-----	37
(2) Mol Psychiat 7 (2002) 234-235	-----	47
(4) Eur J Neuroscience (2003) in press	-----	51
6. 添付論文（出版物）		
(1) 脳の科学 Vol. 23 No. 11 (2001) 1000-1002	-----	67
(2) CLINICAL NEUROSCIENCE Vol. 19 No. 12 (2001) 105	-----	71
(3) Annual Review 神経 2003 (2003) 18-23	-----	73

1. はしがき

この冊子は、平成13年度および14年度の科学研究費補助金・基盤研究(C)「抑制性シナプス伝達の可塑性の生理的意義」(研究課題番号 13680899)に基づいて行われた研究の成果をまとめたものである。

研究意図

神経細胞間の情報伝達効率は、神経活動依存的に変化する。このようなシナプス伝達の可塑性は記憶・学習の基礎的要素と考えられている。中枢ニューロン間のシナプス伝達の可塑性については、これまでもっぱら興奮性シナプスについて研究されてきた。しかし、抑制性シナプスにも可塑的変化の見られることが近年相次いで報告され、その役割について関心が持たれるようになってきた。

我々はこれまで、記憶・学習に深く関わっている脳の海馬という領域の抑制性シナプス伝達の短期的な可塑性(DSI: depolarization-induced suppression of inhibition)について研究してきた。その結果、DSIに内因性カンナビノイドが逆行性伝達物質として働いていることが明らかとなった。本研究では、抑制性シナプス伝達の内因性カンナビノイドによる逆行性調節の全貌を明らかにし、さらに、その生理的役割の解明を試みた。

2. 研究組織・研究発表

研究組織

研究代表者：少作隆子

(金沢大学大学院医学系研究科 シナプス発達・機能学) 助教授

この研究を遂行するにあたり、下記の人々のご協力およびご指導を頂きました。ここに、その氏名を記して厚く感謝致します。

前島隆司 (金沢大学大学院医学系研究科・研究員)

福留優子 (金沢大学大学院自然科学研究科・大学院生)

狩野方伸 (金沢大学大学院医学系研究科・教授)

交付決定額 (配分類)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	2 1 0 0	0	2 1 0 0
平成 14 年度	1 5 0 0	0	1 5 0 0
総計	3 6 0 0	0	3 6 0 0

研究発表

(1) 学会誌等

1. Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H. and Kano, M., Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* 15 (2002) 953-961.
2. Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda N., Zimmer, A. and Kano, M., Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22 (2002) 3864-3872.
3. Kano, M., Ohno-Shosaku, T. and Maejima, T., Retrograde signaling at central synapses via endogenous cannabinoids. *Mol. Psychiat.* 7 (2002) 234-235.
4. Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H.,

Taketo, M. M., Manabe, T. and Kano, M., Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* (2003) (in press)

(2) 口頭発表

1. 少作隆子、前島隆司、水島伊知郎、米田憲秀、狩野方伸。内因性カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達調節。第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会、2001 年 9 月 26-28 日
2. 少作隆子、狩野方伸。内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達調節：代謝型グルタミン酸受容体の増強作用。第 79 回日本生理学会大会、2002 年 3 月 28-30 日
3. Kano, M. and Ohno-Shosaku, T., Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of hippocampal synapses. 第 25 回日本神経科学大会、2002 年 7 月 7-9 日
4. 少作隆子、狩野方伸。シナプス伝達調節におけるシナプス前側・後側の代謝型受容体の役割。第 80 回日本生理学会大会・第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 24-26 日。
5. 福留優子、少作隆子、狩野方伸。内因性カンナビノイド 3 種のシナプス伝達抑制作用の比較。第 80 回日本生理学会大会・第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 24-26 日。

(3) 出版物

1. 少作隆子、前島隆司、狩野方伸。脳内カンナビノイド受容体とシナプス伝達調節。脳科学 Vol. 23, No. 11, pp100-1002 (2001 年 11 月 11 日発行、星和書店)
2. 前島隆司、少作隆子、狩野方伸。カンナビノイド受容体と逆行性シグナル伝達。CLINICAL NEUROSCIENCE 別冊 Vol. 19, No. 12, pp105 (2001 年 12 月 1 日発行、中外医学社)
3. 少作隆子、前島隆司、狩野方伸。カンナビノイド受容体。Annual Review 神経 2003、pp18-24 (2003 年 1 月 25 日発行、中外医学社)

3. 研究成果

(1) 研究の背景

中枢ニューロン間のシナプス伝達は神経活動依存的に調節されている。この活動依存的なシナプス伝達調節機構は、記憶・学習などさまざまな脳機能において重要な役割を担っており、そのメカニズムについて精力的に研究されてきた。その研究過程において、シナプス後ニューロンから放出され、シナプス前ニューロンに作用する因子、いわゆる逆行性伝達物質 (retrograde messenger) が、活動依存的なシナプス伝達調節に重要な働きをしている可能性が指摘され、注目を集めていた。

10 年程前に、脳切片標本を用いて、小脳および海馬の抑制性シナプス伝達が、シナプス後ニューロンの脱分極により一過性に抑制される現象 (DSI: depolarization-induced suppression of inhibition) が報告され、この DSI の発現に逆行性伝達物質が関与していることが示唆された。我々は、DSI のメカニズム、特に逆行性伝達物質の実体を明らかにする目的で研究を始め、まず、培養海馬ニューロン・ペアという極めてシンプルな実験系で DSI を再現することに成功した。次に、その再現された DSI に逆行性伝達物質が関与していることを確かめ、さらにその逆行性伝達物質が内因性カンナビノイドであることを明らかにした。

(2) 研究目的

本研究の目的は、海馬抑制性シナプス伝達の内因性カンナビノイドによる逆行性調節の全貌を明らかにすること、および、その生理的役割を解明することである。具体的には、培養海馬ニューロン・ペアを用いて、抑制性シナプス伝達がシナプス後ニューロンの活動によりどのように調節されるのかを詳細に解析し、その調節における内因性カンナビノイドの役割を明らかにする。また、内因性カンナビノイドの合成・放出に影響をおよぼす因子を調べ、さらに、カンナビノイドの興奮性および抑制性シナプス伝達に対する作用を比較する。以上の結果より、海馬の神経機能において、内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達調節がどのような役割を担っているのかを明らかにする。

(3) 研究方法

実験材料としては主に新生仔ラットの培養海馬ニューロンを用いた。1～2日令ラットより海馬を取り出し、細かく刻んだ後にピペッティングにより細胞をバラバラにし、ポリオルニチンでコーティングした培養皿に移し、37℃、5 % CO₂ の条件で1～2週間培養したものを実験に用いた。また、一部の実験では、マウスの培養海馬ニューロンやラットおよびマウスの海馬スライス標本を用いて実験を行った。

シナプスを形成している2個のニューロンをパッチ電極で共にホール・セル・クランプし、一方を刺激し、他方よりシナプス後電流を記録した(図1)。この方法では、単シナプス性(monosynaptic)の単一ニューロン由来のシナプス後電流(unitary postsynaptic current)を測定することができ、シナプス伝達効率がどのように変化するかをより直接的に観測することができる。記録されるシナプス後電流は、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス後電流(EPSC)とGABA作動性の抑制性シナプス後電流(IPSC)の2種類であるが、両者は、時間経過、逆転電位、阻害剤の効果の違いにより容易に区別することができる(図1)。

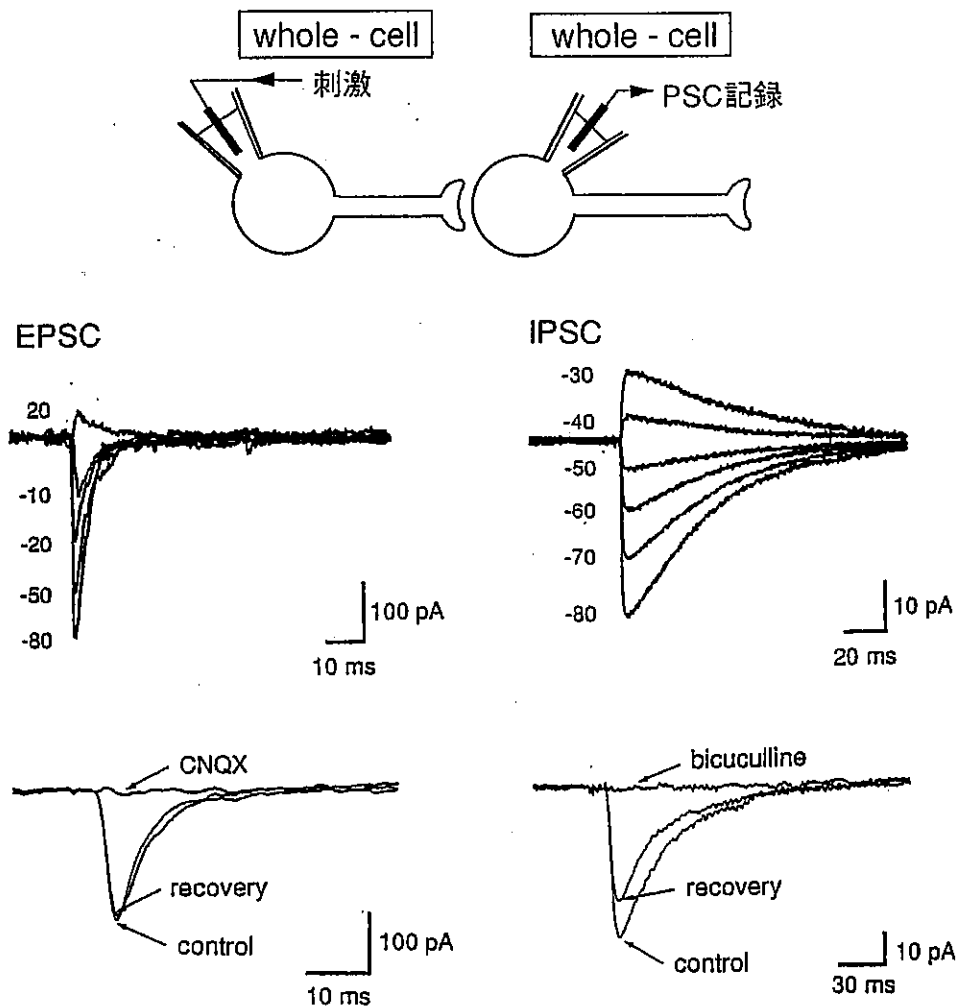


図1 興奮性シナプス後電流(EPSC)と抑制性シナプス後電流(IPSC)の同定。2個の培養海馬ニューロンを2本のパッチ電極で共にホールセル・クランプし、一方のニューロンを刺激し、他方のニューロンよりシナプス後電流を測定する。EPSCとIPSCは、そのdecayの速さ、逆転電位、阻害剤の効果の違いにより容易に区別することができる。

(4) 研究結果

I型代謝型グルタミン酸受容体アゴニスト (DHPG) は抑制性シナプス伝達を抑制する

IPSC に対する DHPG (I 型グルタミン酸受容体アゴニスト) の効果を調べた。約半数のペアでは DHPG により IPSC は変化しなかったが、残り半数では IPSC の振幅が小さくなった (図 2、A と B)。この DHPG の IPSC 抑制作用は、I/II 型グルタミン酸受容体アゴニストの MCPG や I 型グルタミン酸受容体の一つである mGluR5 の特異的アンタゴニストの MEPE で阻害された (図 2、C)。また、DHPG による IPSC の抑制は paired-pulse ratio (PP 比) の上昇を伴う (図 2、D) ことは、I 型グルタミン酸受容体の活性化により、シナプス前終末からの伝達物質 GABA の放出が抑制されることを示す。

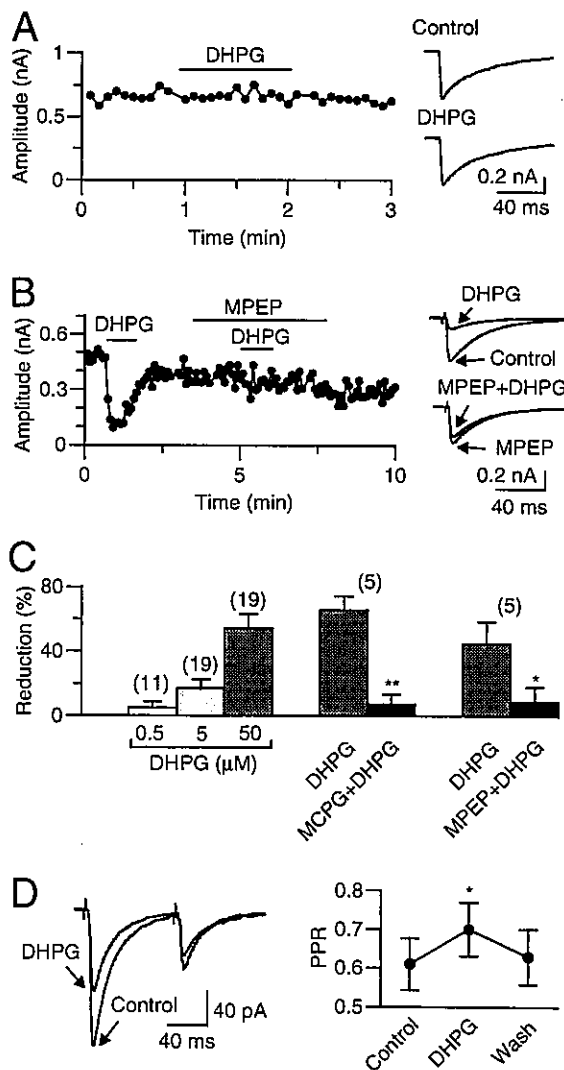


図 2 DHPG による IPSC の抑制。
 A: DHPG 非感受性の IPSC の例。縦軸は IPSC の振幅、横軸は時間。右のトレースは DHPG 投与前後の IPSC 波形の代表例。
 B: DHPG 感受性の IPSC の例。DHPG による IPSC の抑制は mGluR5 阻害剤の MPEP で阻害される。
 C: DHPG 感受性 IPSC で得られた DHPG 効果の濃度依存性、および DHPG の IPSC 抑制作用に対する mGluR 阻害剤 (MCPG および MPEP) の阻害作用。
 D: DHPG による IPSC の抑制は paired-pulse 比の上昇を伴う。一例 (左) と平均値 (右) を示す。

DHPG の抑制作用はカンナビノイド受容体を介している

我々はすでに、抑制性シナプスには、カンナビノイド感受性のもの（カンナビノイドアゴニストの WIN55,212-2 により IPSC が小さくなるシナプス）と非感受性のもの（WIN55,212-2 の影響を受けないシナプス）とがあることを報告している。そこで、WIN55,212-2 の効果と DHPG の効果の相関を調べたところ、DHPG による IPSC の抑制は WIN55,212-2 感受性のシナプスでのみ見られることが判明した（図 3）。また、WIN55,212-2 および DHPG による IPSC の抑制は、カンナビノイド受容体阻害剤（AM281、SR141716A）により完全に消失した（図 4）。以上の結果は、DHPG による IPSC の抑制にはカンナビノイド受容体の活性化が必要であることを示す。

DHPG は脱分極による内因性カンナビノイド放出を促進させる

シナプス後ニューロンを脱分極させると、IPSC が一過性に小さくなる DSI という現象が見られる。我々は、前研究課題により、以下のような DSI のメカニズムを明らかにした。(1) シナプス後ニューロンを脱分極させると、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外の Ca^{2+} が細

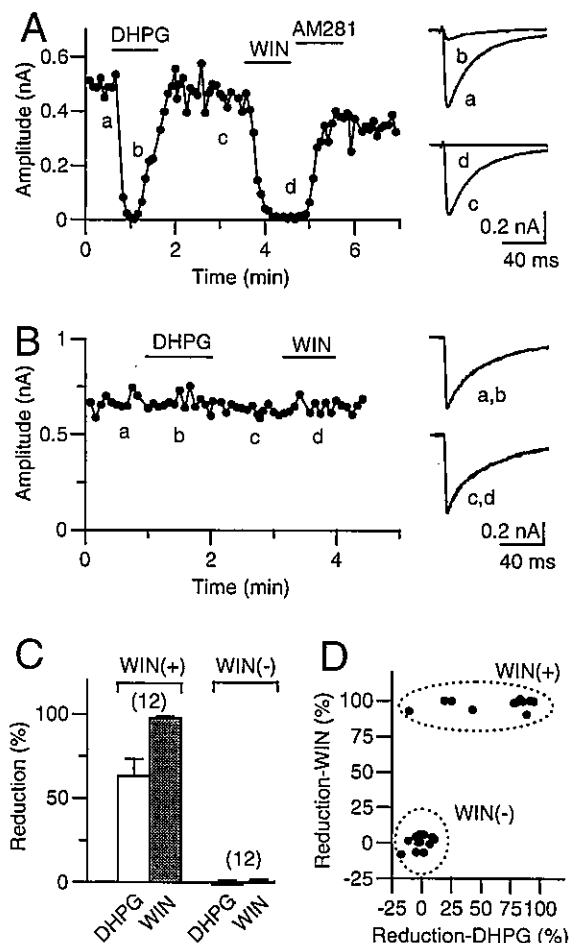


図 3 DHPG による IPSC の抑制はカンナビノイド感受性のシナプスでのみみられる。A: カンナビノイド感受性 IPSC の例。DHPG および WIN55,212-2 は IPSC を抑制する。B: カンナビノイド非感受性 IPSC の例。DHPG および WIN55,212-2 は IPSC に対し無効である。C: カンナビノイド感受性 (WIN(+)) シナプスでは、IPSC は DHPG により小さくなる。しかし、カンナビノイド非感受性 (WIN(-)) シナプスでは、IPSC は DHPG により変化しない。D: DHPG による IPSC の抑制の大きさ (横軸) と WIN55,212-2 による IPSC の抑制の大きさ (縦軸) との間の相関。

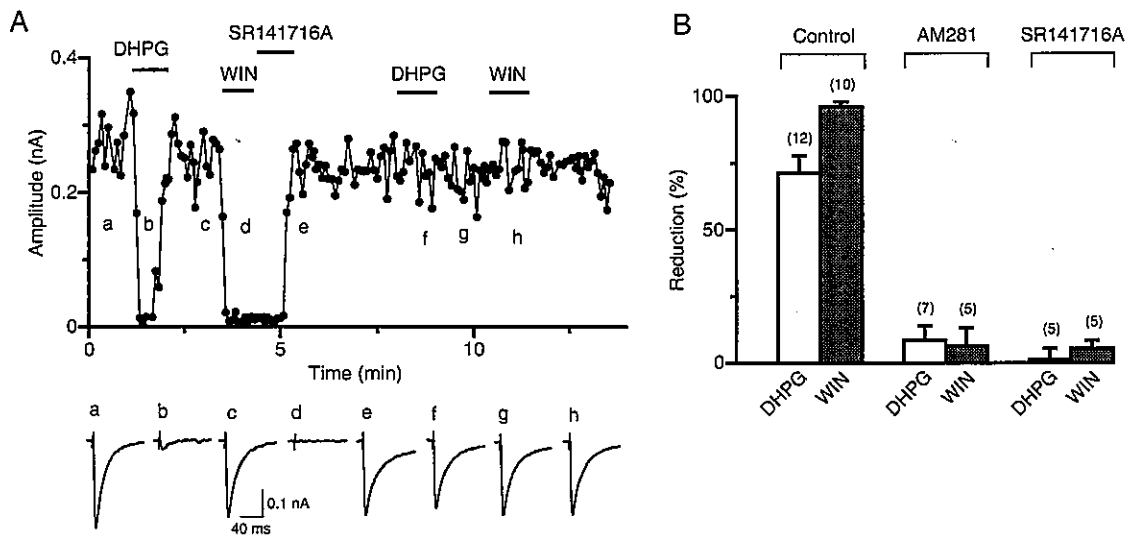


図4 DHPG による IPSC の抑制はカンナビノイド受容体を介する。DHPG および WIN55,212-2 による IPSC の抑制はカンナビノイド受容体阻害剤 (AM281 あるいは SR141716A) 処理後完全に消失する。実験の一例 (A) および平均値 (B)。

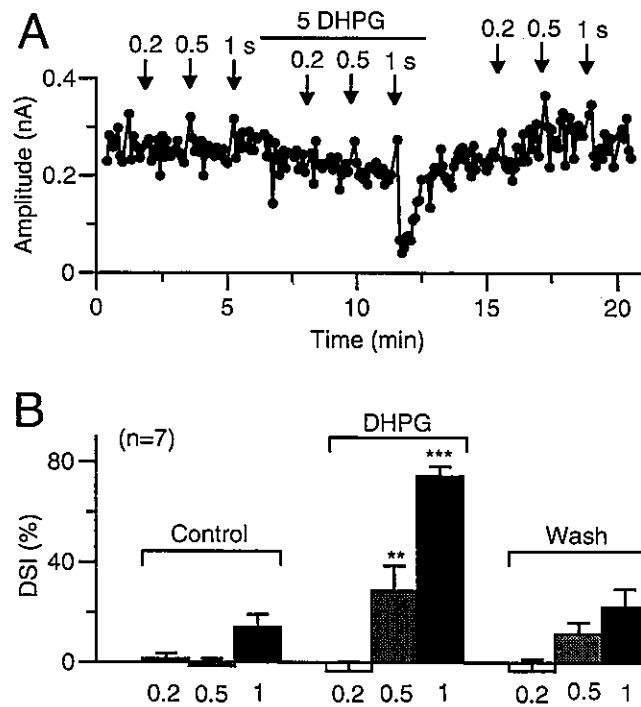


図5 DHPG の DSI 促進作用。↓の時点でシナプス後ニューロンを 0.2-1 秒間脱分極させ、DSI を誘導している。5 μ M DHPG は DSI を大きくする。実験の一例 (A) および平均値 (B)。

胞内に流入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により内因性カンナビノイドの合成が促進され、それがシナプス後ニューロンより放出される。(3) 放出された内因性カンナビノイドは抑制性シナプス前終末部のカンナビノイド受容体を活性化し、終末からの伝達物質 GABA の放出を抑制する。

脱分極の持続時間を変え、どの程度の DSI が起こるかを DHPG 投与前後で比較したところ、0.5 秒および 1 秒脱分極による DSI の大きさは $5 \mu\text{MDHPG}$ により増大した (図 5)。また、1 秒脱分極を用いて DHPG の濃度依存性を調べたところ、 $0.5 \mu\text{M}$ 以上の濃度で DSI の促進作用が見られた (図 6)。また、この DHPG による DSI の促進は、シナプス後ニューロンへの GDPβS 投与や mGluR5 特異的アンタゴニストの MEPE の bath application により阻害された (図 6、B)。

また、「1 秒脱分極」「 $5 \mu\text{MDHPG}$ 」「1 秒脱分極+ $5 \mu\text{MDHPG}$ 」の 3 条件において、どの程度の内因性カンナビノイドが放出されるかを、IPSC 振幅の WIN55,212-2 濃度依存性曲線より推定することを試みた。その結果、脱分極と DHPG を組み合わせると、それぞれ単独の場合に放出される量を合わせたものより数倍多くのカンナビノイドが放出されると推定された (図 7)。

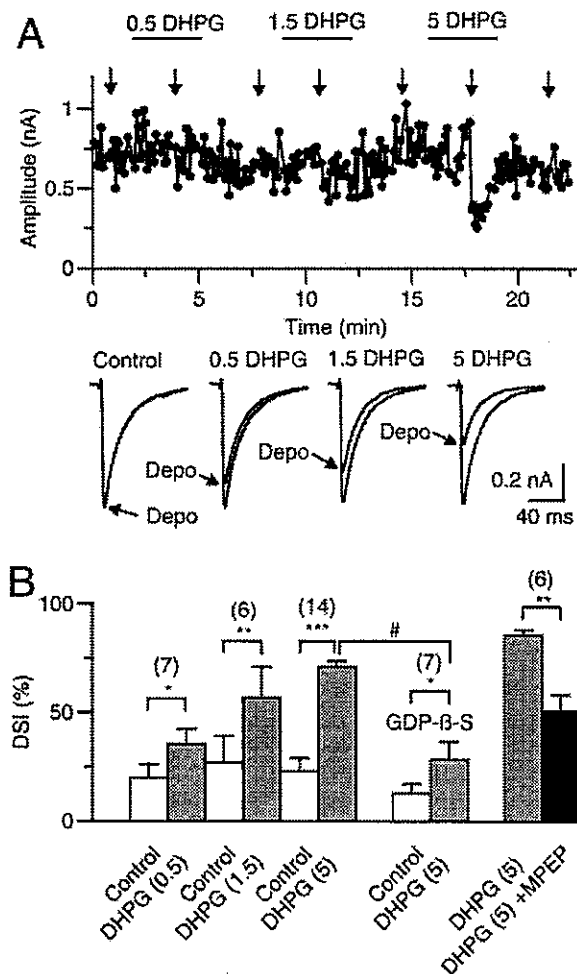


図 6 DHPG の DSI 促進作用の濃度依存性。A: 実験の一例。↓の時点でシナプス後ニューロンを 1 秒間脱分極させ、DSI を誘導している。投与する DHPG の濃度を $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1.5 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ と上げると、濃度依存的に DSI を大きくする。B: A と同様の実験結果のまとめ (左半分)。DHPG の DSI 促進作用は GDPβS や MPEP で阻害される (右半分)。

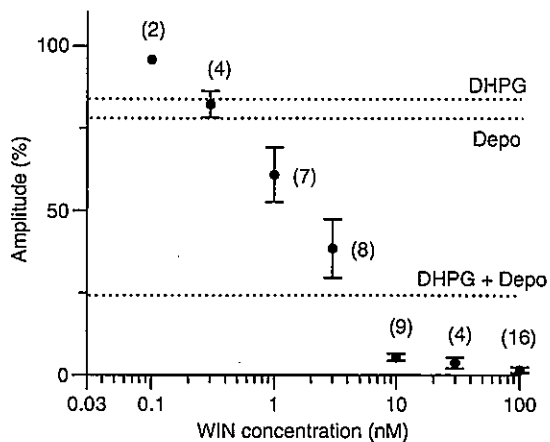


図7 WIN55,212-2 の IPSC 抑制作用の濃度依存性。横軸が WIN55,212-2 の濃度、縦軸が IPSC の振幅。WIN55,212-2 投与前の振幅を 100 % とする。点線は 5 μ M DHPG 単独 (DHPG)、1 秒脱分極 (Depo)、5 μ M DHPG 存在下での 1 秒脱分極 (DHPG+Depo) の時の IPSC 振幅の平均値のレベルを示す。

以上より、脱分極と I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化は内因性カンナビノイドの合成・放出に対し協調的に作用することが示唆される。

脱分極による細胞内 Ca 濃度上昇は DHPG により変化しない

DHPG による DSI の促進が、脱分極による細胞内 Ca 濃度上昇を増大させることによるのかどうかを調べるために、Ca 蛍光指示薬 (fura-2) を用いて細胞内 Ca 濃度を測定した。その結果、basal の細胞内 Ca 濃度および脱分極による Ca 濃度上昇はいずれも DHPG により影響を受けなかった (図 8)。したがって、DHPG は Ca 濃度上昇より下流に作用し、内因性カンナビノイドの合成を促進させると考えられる。

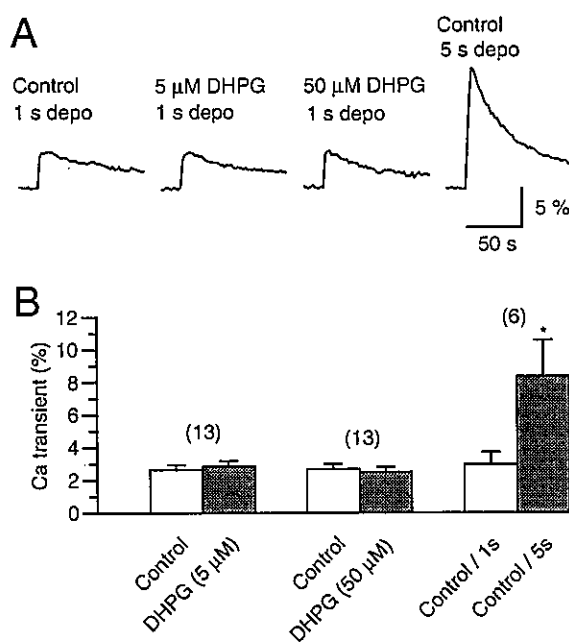


図8 DHPG は脱分極による細胞内 Ca 濃度上昇の大きさを変えない。
A: 実験の一例。1 秒脱分極、5 μ M および 50 μ M DHPG 存在下での 1 秒脱分極、5 秒脱分極による Ca 濃度変化を、fura2- の蛍光強度比 (F360/F380) の変化として表示。
B: 実験結果のまとめ。

DHPG による DSI 促進作用は海馬スライス標本でも見られる

培養海馬ニューロンで見られた DHPG による DSI 促進作用が海馬スライス標本においても見られるかどうかを調べた。海馬スライスの CA1 領域の錐体細胞より IPSC を記録し、3 秒脱分極により DSI を誘導し、5 μ M DHPG の効果を調べたところ、DSI が促進されることが確かめられた (図 9)。

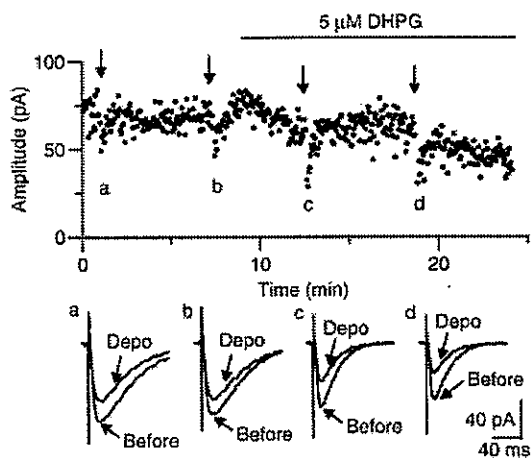


図 9 海馬スライス標本における DHPG による DSI の促進作用。CA1 錐体細胞より記録される IPSC の DSI は 5 μ M DHPG により促進される。

シナプス後ニューロンの脱分極により放出された内因性カンナビノイドは抑制性シナプス伝達のみならず興奮性シナプス伝達も一過性に抑制する

これまでの、シナプス後ニューロンの脱分極により 抑制性シナプス伝達が一過性に抑制され

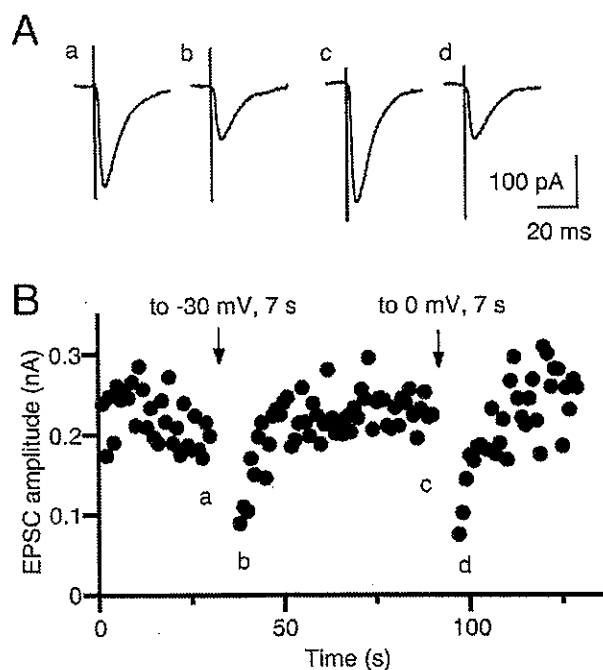


図 10 海馬スライス標本における DSE の例。CA1 錐体細胞より EPSC を記録し、シナプス後ニューロンを 7 秒間脱分極させることにより DSE を誘導する。

る DSI という現象について調べてきた。しかし、小脳では、脱分極により興奮性シナプス伝達が一過性に抑制される DSE (depolarization-induced suppression of excitation) という現象が報告されている。そこで、スライス標本を用いて、海馬においても DSE が見られるかどうかを調べた。

海馬スライス CA1 錐体細胞より EPSC を記録し、 -30 mV まであるいは 0 mV まで 7 秒間脱分極させると、EPSC の振幅は一過性に小さくなり (図 10)、DSE が誘導された。この DSE はカンナビノイド受容体阻害剤 (SR141716A) により完全に消失する (図 11) ことから、DSI と同様に内因性カンナビノイドを介すると考えられる。

DSE は DSI より起こりにくい

海馬スライス標本を用いて、DSI と DSE の起こりやすさを比較した。シナプス後ニューロンの 5 秒脱分極は大きな DSI を誘導するのにに対し、DSE は 5 秒脱分極ではほとんど起こらなかった。しかし、 10 秒脱分極は DSE を誘導することができた (図 12)。

同様の実験を培養海馬ニューロンを用いて行った。図 13 に示すように、DSI は DSE に比べ、より短い脱分極で誘導でき、しかも、より大きな効果が見られる。

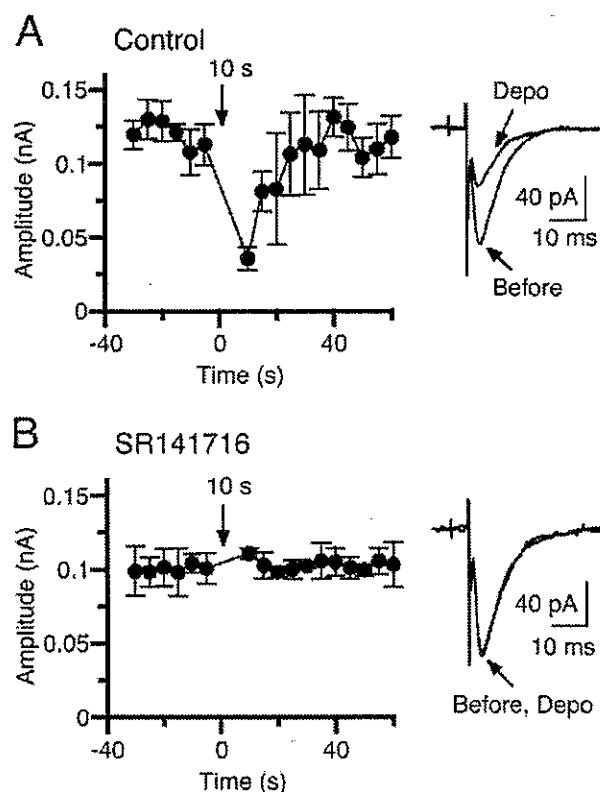


図 11 海馬スライス標本における DSE に対するカンナビノイド受容体阻害剤の効果。10 秒脱分極により引き起こされる DSE (A) は SR141716A 投与により完全に消失する (B)。

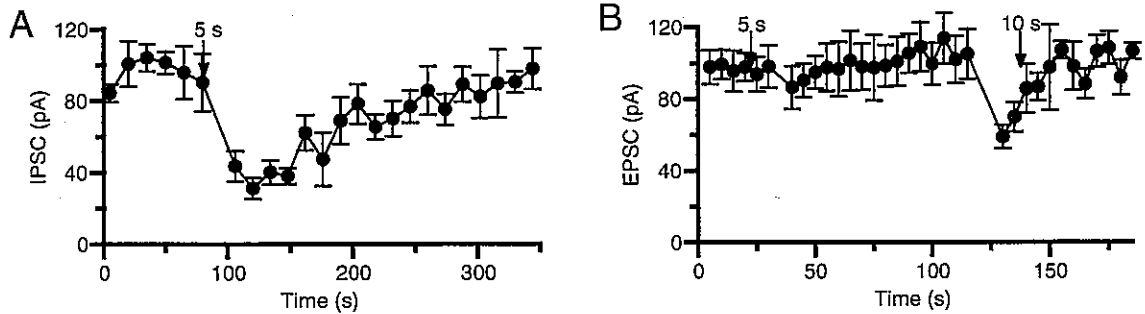


図 12 海馬スライス標本における DSI と DSE の比較。A: 5 秒脱分極による DSI。B: 5 秒脱分極および 10 秒脱分極による DSE。DSE の方が DSI に比べ起こりにくい。

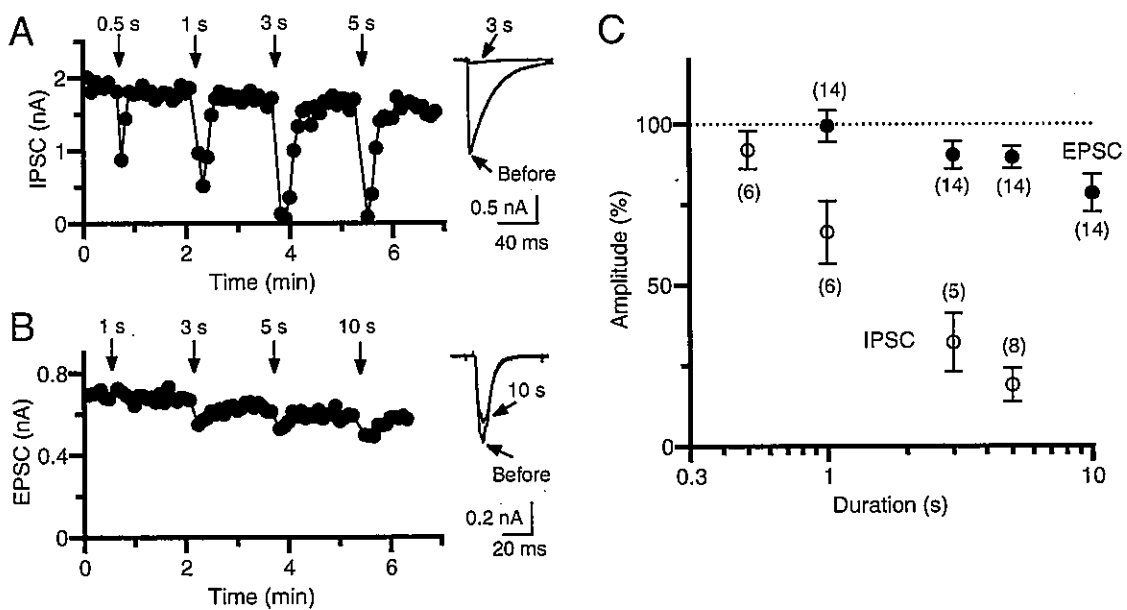


図 13 培養海馬ニューロンにおける DSI と DSE の比較。A: 0.5-5 秒脱分極による DSI の例。B: 1-10 秒脱分極による DSE の例。C: 実験結果のまとめ。横軸が脱分極の持続時間、縦軸は脱分極後の IPSC および EPSC の大きさ。EPSC の減少 (DSE) の方が IPSC の減少 (DSI) に比べ小さい。

興奮性シナプス伝達は抑制性シナプス伝達に比べカンナビノイド感受性が低い

DSE が DSI に比べ起こりにくい原因を調べるために、EPSC と IPSC のカンナビノイド感受性を比較した。EPSC はカンナビノイド感受性の IPSC に比べ、カンナビノイド感受性は低い

(図 14、A)。一方 IPSC は、カンナビノイド感受性のもの (図 14、B) と非感受性のもの (図 14、C) とに二分される。EPSC および IPSC のカンナビノイド感受性曲線 (図 15、A) を用い、5 秒脱分極により誘導される DSE および DSI の大きさからシナプス周囲のカンナビノイド濃度を推定したところ、いずれの場合も約 5 μM 付近となった。したがって、DSE が DSI に比べ起こりにくいことは、EPSC のカンナビノイド感受性が IPSC に比べ低いことで説明することができる。

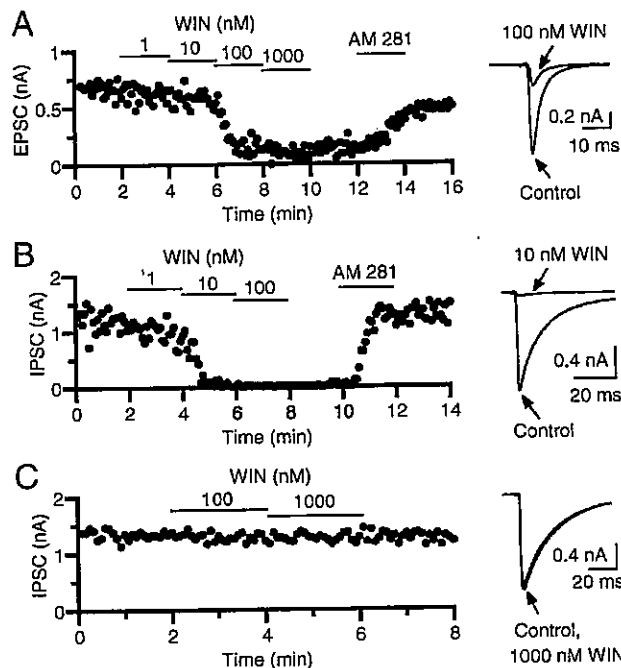


図 14 EPSC と IPSC のカンナビノイド感受性の比較の例。A: 1-1000 nM WIN55,212-2 による EPSC の抑制の一例。B: 1-100 nM WIN55,212-2 による IPSC の抑制の一例。C: カンナビノイド非感受性 IPSC の例。100-1000 nM WIN55,212-2 は無効。

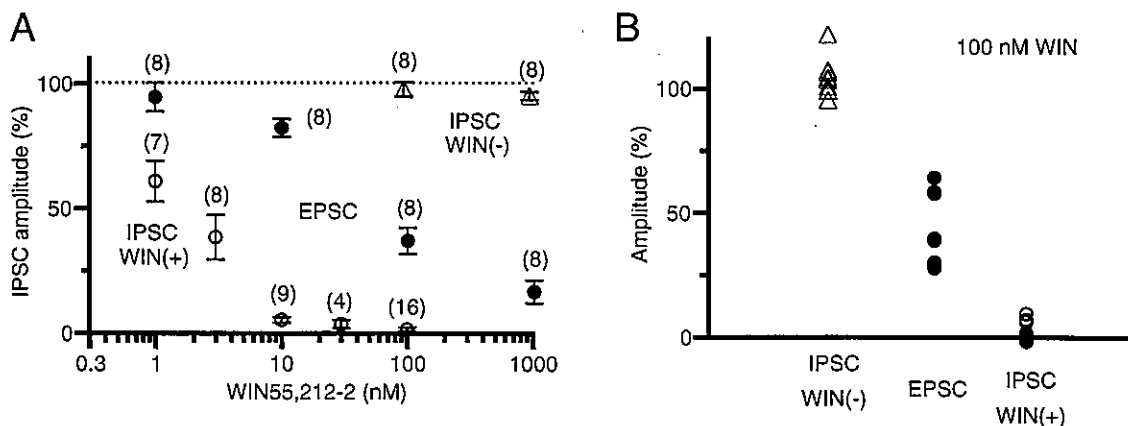


図 15 EPSC と IPSC のカンナビノイド感受性の比較。A: 横軸が WIN55,212-2 の濃度、縦軸が EPSC (●)、カンナビノイド感受性 IPSC (○) およびカンナビノイド非感受性 IPSC (△)。B: EPSC (●)、カンナビノイド感受性 IPSC (○) およびカンナビノイド非感受性 IPSC (△) に対する 100 nM WIN55,212-2 の効果の個々のデータ。

抑制性および興奮性シナプス前終末のカンナビノイド受容体は CB1 である

抑制性シナプス前終末のカンナビノイド受容体は CB1 であることはすでに報告されている。しかし、興奮性シナプス前終末のカンナビノイド受容体のタイプについてはまだわかっていない。そこで、CB1 ノックアウト・マウスを用いて受容体のタイプについて調べた。CB1 ノックアウト・マウスから培養した海馬ニューロンでは、DSI も WIN55,212-2 による IPSC の抑制も見られず、抑制性シナプス前終末のカンナビノイド受容体が CB1 であることが確かめられた。また、DSE も WIN55,212-2 による EPSC の抑制も完全に消失しており (図 16)、興奮性シナプス前終末のカンナビノイド受容体も CB1 であることが判明した。

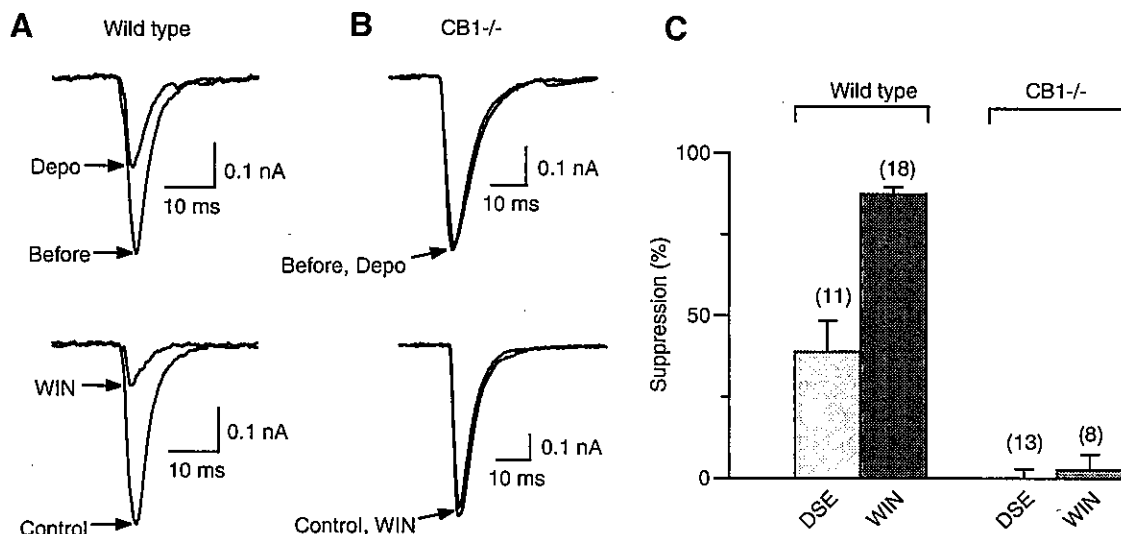


図 16 興奮性シナプス前終末のカンナビノイド受容体は CB1。A: DSE は正常マウスの海馬ニューロン (左) では起こるが CB1-/-マウスのニューロンでは起こらない。B: WIN55,212-2 による EPSC の抑制は正常マウスのニューロン (左) では起こるが CB1-/-マウスのニューロンでは起こらない。C: 実験結果のまとめ。

シナプス後ニューロンのムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化は DSI を促進させる

アセチルコリンは海馬機能を修飾する重要な伝達物質の一つである。そこで、海馬のカンナビノイド系に対するアセチルコリンの作用を調べた。アセチルコリン受容体アゴニストのカルバコール (CCh) は 30 nM 以上で DSI を促進させる作用が見られた (図 17)。この CCh の DSI 促進作用は、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) アンタゴニストのアトロピンで阻

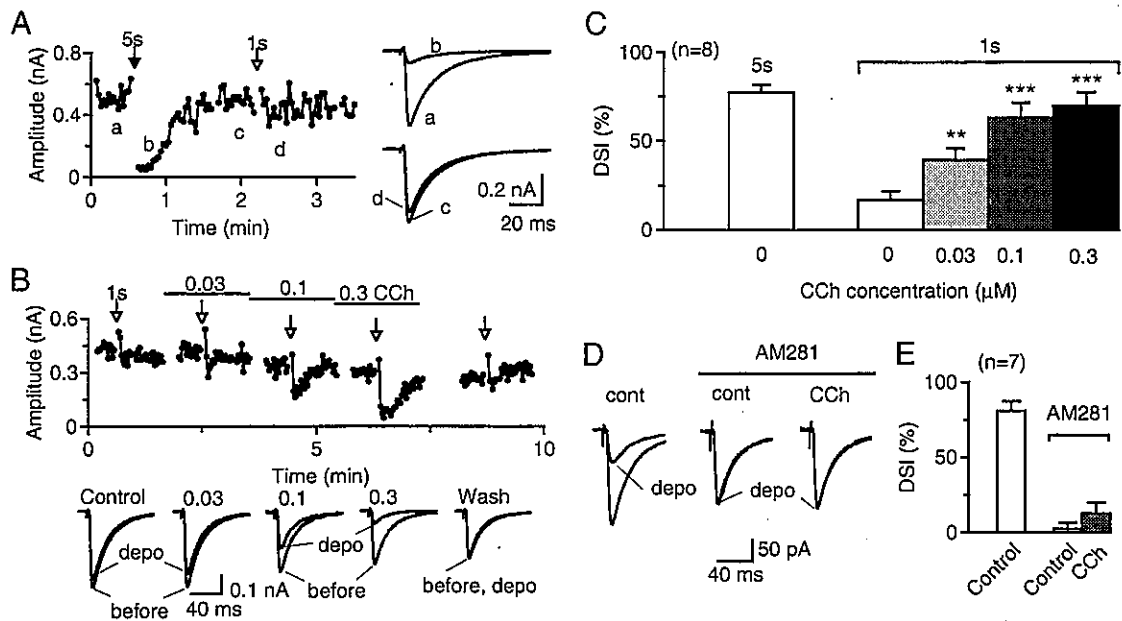


図 17 CCh による DSI の促進。A: DSI の脱分極時間依存性。5 秒脱分極は大きな DSI を誘導するが 1 秒脱分極は明かな DSI を誘導できない。B: CCh 非存在下で 1 秒脱分極による DSI が見られない場合でも、CCh を投与すると濃度依存的に大きな DSI が出現する。C: B と同様の実験結果のまとめ。D, E: DSI も CCh による DSI の促進もカンナビノイド受容体阻害剤 (AM281) で阻害される。実験の一例 (D) と結果のまとめ (E)。

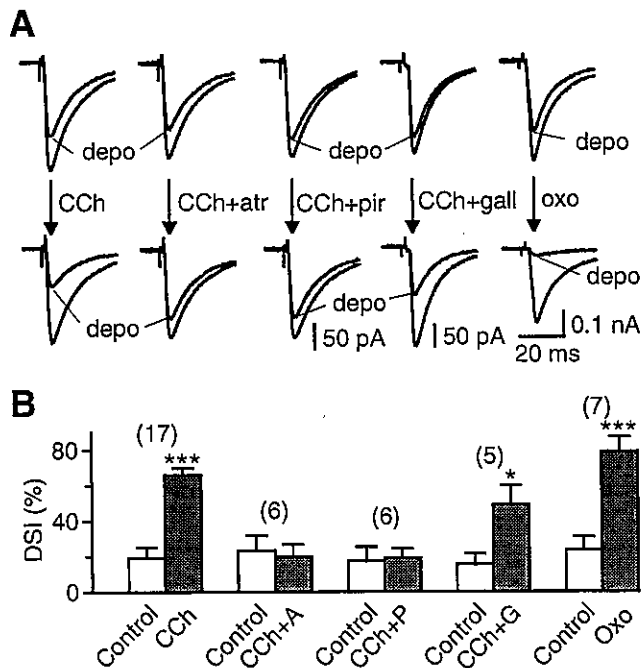


図 18 CCh による DSI の促進はムスカリン性アセチルコリン受容体を介する。A: 実験の一例。CCh による DSI の促進作用はアトロピンおよびピレンゼピンで阻害されるが、ガラミンでは阻害されない。また、oxotremoline-M は CCh と同様に DSI を促進させる。B: 実験結果のまとめ。

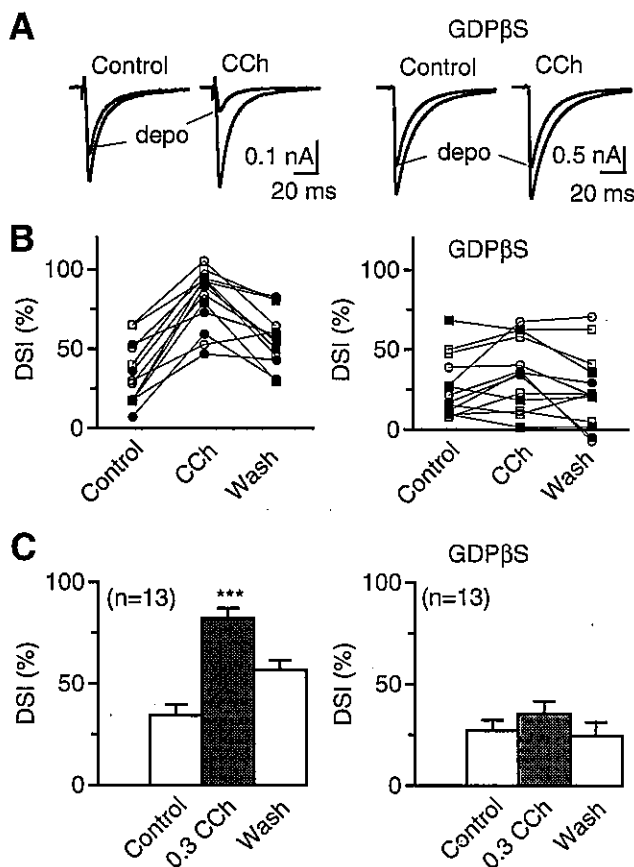


図 19 シナプス後ニューロンへの GDPβS 投与は CCh の DSI 促進作用を阻害する。A: 実験の一例。B: 個々の実験データ。C: 結果のまとめ。

害された (図 18)。また、mAChR アゴニストの oxotremorine-M も CCh と同様の効果を示した (図 18)。さらに、シナプス後ニューロンに GDPβS を投与すると CCh の作用が消失することが判明した (図 19)。以上の結果より、CCh はシナプス後ニューロンの mAChR を活性化することにより DSI を促進させると考えられた。

CCh は脱分極による内因性カンナビノイドの放出を促進させる

CCh は IPSC のカンナビノイド感受性に影響を及ぼさない (図 20、A) ことから、CCh はシナプス後ニューロンからのカンナビノイド放出量を増大させると考えられる。そこで、「脱分極」「CCh」「脱分極+CCh」の 3 条件において、どの程度の内因性カンナビノイドが放出されるかを、IPSC 振幅の WIN55,212-2 濃度依存性曲線より推定することを試みた。その結果、脱分極と CCh を組み合わせると、それぞれ単独の場合に放出される量を合わせたものより数倍以上多くの量のカンナビノイドが放出されると推定された (図 20、B と C)。以上より、脱分極とムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化は内因性カンナビノイドの合成・放出に対し協調的に作用することが示唆される。

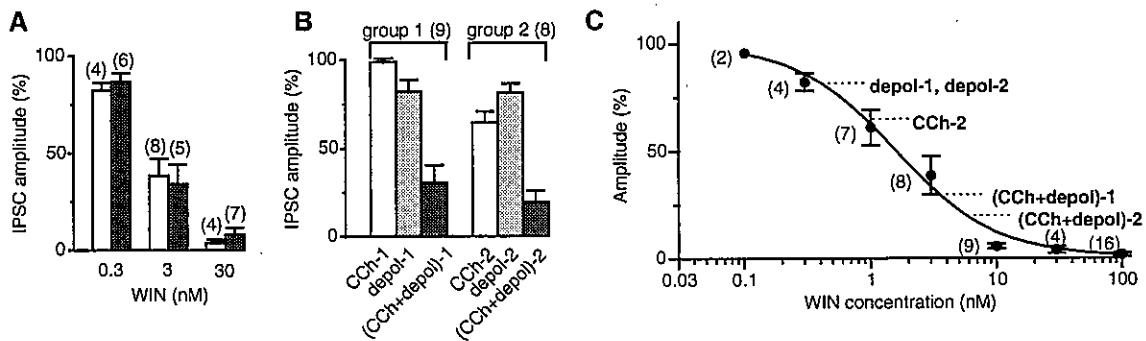


図 20 CCh は脱分極による内因性カンナビノイドの放出を促進する。A: IPSC の WIN55,212-2 感受性は 0.3 μ M CCh (灰色) で変化しない。B: 0.3 μ M CCh、脱分極、および 0.3 μ M CCh+脱分極による IPSC の抑制。CCh 単独効果の有無により 2 つのグループに分けている。C: IPSC の WIN55,212-2 感受性曲線を用いて、B の各条件での IPSC の抑制の大きさから放出されるカンナビノイド量を推定する。

DSI の促進作用は M1 および M3 受容体を介する

DSI の促進に關与する mAChR のタイプを同定するために、各タイプのノックアウトマウスから培養した海馬ニューロンを用いて、oxotremorine-M の DSI 促進作用を比較した。DSI の促進は M1 ノックアウトおよび M3 ノックアウトマウスで小さくなり、M1/M3 ダブルノックアウトマウスで完全に消失した (図 21)。一方、DHPG の DSI 促進作用はいずれのタイプでも変

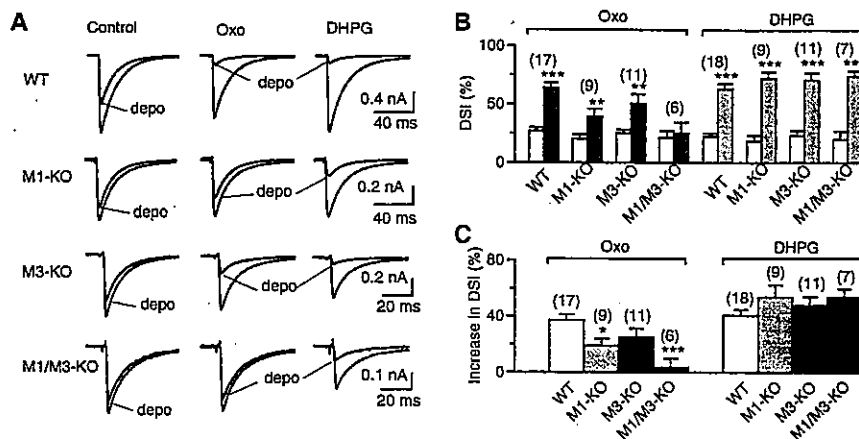


図 21 oxotremorine-M による DSI の促進は M1/M3 受容体を介する。A: 正常、M1 欠損、M3 欠損、M1 および M3 の二重欠損マウスの海馬ニューロンを用いて、DSI に対する 0.3 μ M oxotremorine-M および 5 μ M DHPG の効果を調べた一例。B: 実験結果のまとめ。

化はなかった。以上より、DSI の促進に關与する mAChR のタイプは M1 と M3 であることが判明した。

内因性カンナビノイドを介する逆行性シナプス伝達調節のメカニズム

図 22 は以上の結果をまとめたモデル図である。シナプス後ニューロンの脱分極は細胞内 Ca 濃度上昇を介して内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こす。また、I 型グルタミン酸受容体および M1/M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体の活性化は単独であるいは脱分極による細胞内 Ca 濃度上昇と協調的に働いて内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こす。シナプス後ニューロンから放出された内因性カンナビノイドは、興奮性および一部の抑制性シナプス前終末の CB1 受容体を活性化し、伝達物質（グルタミン酸および GABA）の放出を抑制する。海馬では、このような内因性カンナビノイドによるシナプス伝達の逆行性調節は、一部（カンナビノイド感受性）の抑制性シナプスで起こりやすく、興奮性シナプスでは起こりにくい。

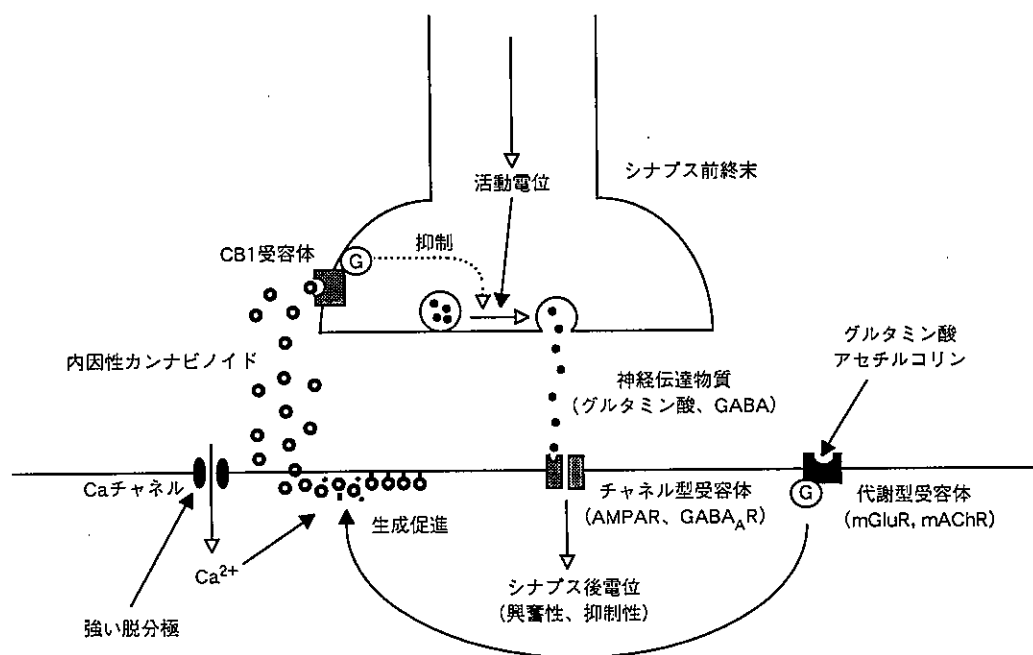


図 22 内因性カンナビノイドを介する逆行性調節のモデル。

(5) 今後の展開

本研究では、主に海馬の抑制性シナプスを用い、シナプス後ニューロンの活動（脱分極および受容体の活性化）に依存したシナプス伝達の調節に、内因性カンナビノイドを介した逆行性シグナルが重要な役割を担っていることを明らかにした。カンナビノイド受容体およびカンナビノイドの放出を引き起こす代謝型グルタミン酸受容体やムスカリン性アセチルコリン受容体は脳に広く分布する。また、カンナビノイド受容体の活性化はグルタミン酸や GABA 以外の様々な伝達物質の放出をも抑制することが知られている。したがって、内因性カンナビノイドによる活動依存的な伝達調節は、脳のさまざまな領域のさまざまなシナプスにおいて見られる基本的な現象である可能性がある。今後は、海馬のカンナビノイド感受性の抑制性シナプスが海馬機能においてどのような役割を担っているのかを明らかにすると共に、内因性カンナビノイドの海馬機能における生理的役割をさらに明らかにすることを目指す。