

## 平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

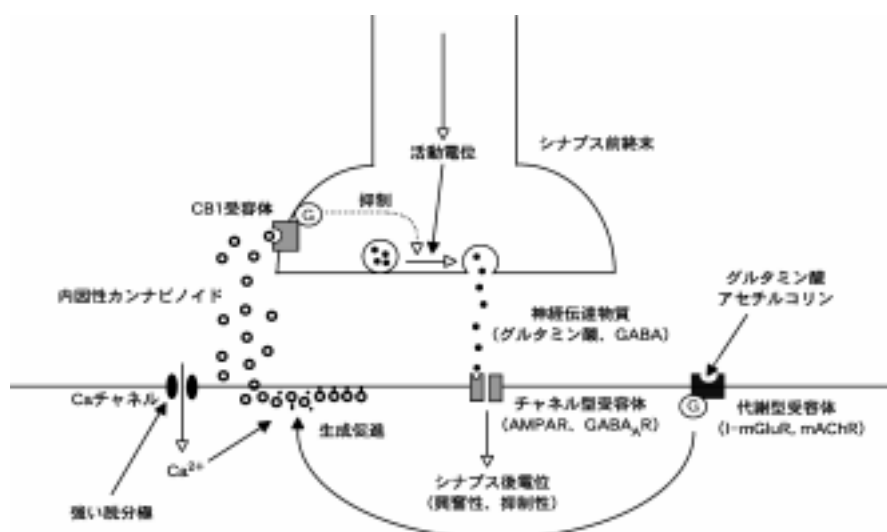
ふりがな		かのう まさのぶ		所属研究機関 ・部局・職		金沢大学・大学院医学系研究科・教授	
研究代表者 氏名		狩野 方伸					
研究 課 題 名	和文	シナプスにおける逆行性伝達物質としての内因性カンナビノイドの作用機構と生理的意義					
	英文	Mode of action and physiological significance of endogenous cannabinoids as a retrograde messenger at central synapses					
研究経費		平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
15年度以降は内約額 金額単位：千円		32,200	19,000	14,600	14,600	14,100	94,500
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
狩野 方伸		金沢大学・大学院医学系研究科・教授		神経科学		電気生理学的解析（スライス） 研究の統括	
少作 隆子		金沢大学・大学院医学系研究科・助教授		神経科学		電気生理学的、生化学的、分子生物学的解析 （海馬培養神経細胞）	
田端 俊英		金沢大学・大学院医学系研究科・助手		神経科学		電気生理学的、生化学的、形態学的解析 （小脳培養神経細胞）	
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>マリファナの活性成分である 9-テトラヒドロカンナビノールは特異的受容体(カンナビノイド受容体)を介して作用を発現する。これらは、7 回膜貫通型の G 蛋白結合型受容体で、CB1 と CB2 の 2 種類がある。CB1 は中枢神経系に広く分布し、マリファナの多様な精神神経作用は CB1 受容体を介すると考えられる。これに対する内因性のリガンド(内因性カンナビノイド)の候補として、アナンダミドと 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)があり、<i>in vitro</i> の実験からその生合成経路が明らかにされつつある。CB1 は中枢ニューロンのシナプス前線維に局在し、シナプス前終末からの伝達物質放出の減少が起こることが知られている。しかし、内因性カンナビノイドがどのような刺激によって生成され、どのような生理機能を果たすかという最も重要な点についてはほとんど明らかにされていない。最近の私たちの研究から、内因性カンナビノイドが、シナプス後部からシナプス前終末に向けて、逆行性にシグナルを伝達することが明らかになった。すなわち、海馬ニューロンを脱分極させて細胞内カルシウム濃度上昇を起こすと、抑制性シナプス終末からの伝達物質放出の一過性減少が起こり、これが CB1 の特異的アンタゴニストによってブロックされた。さらに申請者らは小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプスにおいても、内因性カンナビノイドを介するシナプス前抑制がおこることを発見した。これらの実績を基盤にして、本研究では、海馬および小脳のニューロンを対象にして内因性カンナビノイドのシナプス伝達および機能的神経回路形成における役割を詳細に調べることにより、その作用機構と生理的役割の解明をめざす。</p>							

**これまでの研究経過** (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

海馬、小脳および大脳基底核を用いて、内因性カンナビノイドのシナプス伝達および機能的神経回路形成における役割を調べ、これまでに、以下のような研究成果を得た。

1. シナプス後細胞の脱分極と細胞内カルシウム濃度上昇により内因性カンナビノイドが放出され、逆行性に抑制性および興奮性シナプス終末に作用して伝達物質放出の一過性減少 (**Depolarization-induced Suppression of Inhibition or Excitation: DSI or DSE**) を起こすことを明らかにした (*Neuron* 29: 729-738, 2001; *J. Neurosci.* 22: 3864-3872, 2002)。
2. 小脳プルキンエ細胞のシナプス後部に存在する I 型代謝型グルタミン酸受容体(I-mGluR)の活性化により、興奮性シナプス前終末からの伝達物質放出の減少が起こり、内因性カンナビノイドがその逆行性シグナルを伝達することを発見した。I-mGluR 活性化による内因性カンナビノイド合成・放出はカルシウム非依存性であり、脱分極による合成・放出とは独立の細胞内機構によることが考えられた (*Neuron* 31: 463-475, 2001)。
3. 小脳プルキンエ細胞の DSI も、海馬同様、内因性カンナビノイドによることを明らかにした (*J. Neurosci.* 22: 1690-1697, 2002)。
4. 単離培養海馬ニューロンにおいて、内因性カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達調節は抑制性シナプスだけでなく興奮性シナプスにおいても見られるが、抑制性シナプスに比べ、カンナビノイド感受性がかなり低いことが判明した (*J. Neurosci.* 22: 3864-3872, 2002)。
5. 単離培養海馬ニューロンにおいて、I-mGluRの活性化は、(1)単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、(2)脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を促進すること、が判明した (*Eur. J. Neurosci.* 15: 953-961, 2002)。
6. 大脳基底核線条体の投射ニューロンである中型有棘細胞においても、海馬や小脳と同様に、脱分極による細胞内カルシウム濃度上昇または I-mGluR の活性化によって内因性カンナビノイドが放出されることを明らかにした (論文準備中)。
7. 内因性カンナビノイドのシナプス形成における役割を明らかにするため、CB1 受容体ノックアウトマウス小脳プルキンエ細胞のシナプスを電気生理学的に解析した。しかし、これまで調べた限りにおいては、2種類の興奮性シナプス(平行線維、登上線維)および抑制性シナプスの生後発達に特に顕著な異常は認められなかった。
8. 海馬培養細胞において、ムスカリニックアセチルコリン受容体の活性化が、(1)単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、(2)脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進すること、を明らかにした (*Eur. J. Neurosci.*, in press)。

以上、1 から 8 の研究成果を、以下の図にまとめた。



内因性カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

1. シナプス後細胞の脱分極と細胞内カルシウム濃度上昇により何らかの逆行性シグナルが生じ、抑制性シナプス終末からの伝達物質放出の一過性減少 (DSI) を起こすことは以前より知られていたが、そのシグナルの実体は長い間不明であって、研究者は 10 年来それを捜し求めていた。私たちと米国の 2 グループが、全く独立に、内因性カンナビノイドが逆行性伝達物質として働くことを明確に示し、これが Nature 誌の News & Views や Science 誌の News として取り上げられ、大きな反響を引き起こした。これまで、シナプスにおける逆行性シナプス伝達物質としては、グルタミン酸、一酸化窒素、一酸化炭素、アラキドン酸など、多くの物質が候補に挙げられてきたが、いずれも当初の実験データに不備があったり、その後の追試実験が伴わず、短期間のうちに研究者に顧みられなくなったという経緯がある。**内因性カンナビノイドは、逆行性シナプス伝達物質として広く認められた最初のものであり、これを発見したことは神経科学の進歩に格段の貢献をしたといえることができる。**
2. また、私たちは、シナプス後部に存在する I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化により、内因性カンナビノイドが産生され、興奮性および抑制性シナプス前終末からの伝達物質放出の減少を引き起こすことを発見した。これは、**上記の細胞内カルシウム濃度上昇による内因性カンナビノイド産生とは独立の機構で、私たちの独創的な発見**である。その正しさは、別の複数の研究者の追従実験によってすでに確認されている。さらに私たちは、I 型代謝型グルタミン酸受容体の活性化は、単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進することを発見した。この事実は、**細胞内カルシウム濃度上昇と I 型代謝型グルタミン酸受容体活性化という 2 つの独立した内因性カンナビノイド産生機構の間にポジティブな相互作用があることを意味しており、動物の脳の中で実際にどのような活動によっての内因性カンナビノイドが産生されるかを理解するうえで重要な知見**である。
3. さらに最近、ムスカリニックアセチルコリン受容体の活性化が、I 型代謝型グルタミン酸受容体活性化と同様の作用を示すことを明らかにした。すなわち、ムスカリニックアゴニストが、単独で内因性カンナビノイドの合成・放出を引き起こすだけでなく、脱分極による内因性カンナビノイドの合成・放出を著明に促進すること、が明らかになった。この事実は、**内因性カンナビノイドの産生が複数の伝達物質の作用によって巧妙に調節されていることを示唆する点**で重要である。また、ムスカリニックアセチルコリン系は記憶・学習などの脳高次機能との関連で以前より注目されてきたが、その機構を追及するうえで、内因性カンナビノイド系の活性化と調節、という新たな観点が加わった点が今後の研究にとって重要である。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。 ) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 )

### 1 . 学術雑誌等に発表した論文 :

- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. and Kano, M.: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738, (2001).
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. and Kano, M.: Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31: 463-475, (2001).
- Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M. and Kano, M.: Roles of GluR $\delta$ 2 and mGluR1 in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Neurosci.* 21: 9701-9712, (2001).
- Yoshida, T., Hashimoto, K., Zimmer, A., Maejima, T., Araishi, K. and Kano, M.: The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 22: 1690-1697, (2002).
- 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: 953-961, (2002).
- 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: 3864-3872, (2002).
- Tabata, T. and Kano, M.: Heterogeneous intrinsic firing properties of vertebrate retinal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 87: 30-41, (2002).
- Tabata, T., Aiba, A. and Kano, M.: Extracellular calcium controls the dynamic range of neuronal metabotropic glutamate receptor responses. *Mol. Cell. Neurosci.* 20: 56-68, (2002).
- Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M.I. and Kano, M.: Group I metabotropic glutamate receptor signaling via G $\alpha$ q/G $\alpha$ 11 secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 22: 8379-8390, (2002).
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T. and Maejima, T.: Retrograde signaling at central synapses via endogenous cannabinoids. *Mol. Psychiatry* 7: 234-235, (2002).
- Kakizawa, S., Yamada, K., Iino, M., Watanabe, M. and Kano, M.: Effects of insulin-like growth factor I on climbing fiber synapse elimination during cerebellar development. *Eur. J. Neurosci.* 17: 545-554, (2003).
- Fukudome, Y., Tabata, T., Miyoshi, T., Haruki, S., Araishi, K., Sawada, S. and Kano, M.: Insulin-like growth factor-I as a promoting factor for cerebellar Purkinje cell development. *Eur. J. Neurosci.*, 17: 2006-2016, (2003).
- Hashimoto, K. and Kano, M.: Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38: 785-796, (2003).
- Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Yuko Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Manabe, T., and Kano, M.: Postsynaptic M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, in press.

### 2 . 国際会議、学会等 :

以下の2件を含む計9回の国際会議または学会における国際シンポジウムにおいて、招待講演者として、いずれも英語にて発表した。

Japan-UK Workshop "From Molecules to Memory 2002" (2002年8月29日、奈良)

Japan-US Brain Research Cooperative Program, Information Exchange Seminar  
"Neural Signalplexes and Ion Channel Regulation" (2003年3月17日、岡崎)