

氏 名 松 本 信 圭

記憶・学習・空間探索に重要な脳部位である「海馬」は、解剖学的にCA1野、CA2野、CA3野、歯状回の四領域に分けられる。中でもCA2野は、CA1野、CA3野、歯状回と比べ、従来の海馬の生理学的研究から見過ごされてきた。その理由のひとつは、CA2野は他の三つの亜領域より極端に狭く、CA3野とCA1野に挟まれた単なる遷移領域だと思いこまれていたことである。

しかし近年になって、CA2野については、CA1野やCA3野に関する従来の知見からは予想できない機能が多く示唆されてきた。例えば、CA2野は攻撃行動や社会性行動に関与することが明らかになってきている。また、CA2野は、室傍核をはじめとした視床下部の神経核から直接投射を受ける。加えて、CA2野錐体細胞（CA2野における主要な神経細胞）は、バソプレシン1b受容体、オキシトシン受容体、アデノシンA1受容体をはじめとした神経調節物質の受容体も多く発現している。

一方、これらの解剖学的・組織学的知見と行動学的知見とをつなぐ、生体動物における電気生理学的知見は限定的である。生体動物におけるCA2野の電気生理学では、細胞外記録法が用いられ、発火（活動電位）や局所場電位の解析が行われてきた。

細胞外記録法では、発火や局所場電位の特徴を記述できるが、発火を生み出すメカニズムは明らかにできない。神経細胞は膜電位が閾値に達することで発火する。つまり、閾値下の膜電位を観察することによって初めて神経細胞の発火のメカニズムに迫ることができる。

膜電位の観察は、パッチクランプ法により可能である。パッチクランプ法では、単一神経細胞から閾値下の膜電位や活動電位を記録できる。そして、本手法を生体動物に応用することによって、生体でしか観察されない神経活動や、感覚入力と相関した神経活動を詳細に記述できる。

本研究では、CA2野神経細胞の膜電位変動を記述することを目的とし、*in vivo* パッチクランプ法を麻酔下のマウスに適用した。

本研究では、ウレタン麻酔下のマウスの海馬錐体細胞から、*in vivo* パッチクランプ記録をおこなった。まず著者は、海馬の中でも狭い領域であるCA2野からの記録を効率よくおこなうため、皮質の吸引除去手術を導入し、さらに、最も高確率で記録をおこなえる座標の検討をおこなった。

パッチクランプ法により、単一の神経細胞の閾値下膜電位を記録することができる。また、本手法では、記録電極内液に含有させたバイオサイチンを記録ニューロン内に導入し、記録後にニューロンの形態を再構築することができる。また、CA2野の同定は、CA2野特異的なマーカータンパク質であるSTEPの免疫組織化学染色によりおこなった。

著者による記録の結果、CA2錐体細胞の60%は、膜電位が約3 Hzで振動していた（振動性ニューロン）。一方で、CA2野には、特徴的な膜電位振動を示さない錐体細胞も存在した（非振動性ニューロン）。また、コントロールの領域として、CA1野の錐体細胞からも*in vivo* パッチクランプ記録をおこない、膜電位振動を示すか否かを検討した。CA2野には、CA1野と比較して、振動性ニューロンが有意に多く存在することが示された。また、振動性ニューロンと非振動性ニューロンにおいて、発火率や平均膜電位、膜抵抗に有意な差は認められなかった。

以降では、この独特な膜電位振動を示すCA2野の振動性ニューロンの特性について調べている。

CA2野の振動性ニューロンが領域内分布を検討した。ニューロンの再構築像をもとに、細胞体の位置を検出し、CA2野における相対位置を算出した。振動性ニューロンの分布はランダムであることが示された。

3 Hzの膜電位振動は、海馬全体の神経活動を反映している可能性がある。その可能性を検討するため、CA2錐体細胞の膜電位と同時に、海馬の局所場電位を記録し比較をおこなった。高速フーリエ変換をはじめとした複数の解析手法を用いた検証の結果、CA2野の膜電位振動は、海馬全体の神経活動とは独立

して発生することが示唆された。

CA1 錐体細胞は、樹状突起に発現している HCN1 チャネルの寄与により、3 Hz から 5 Hz で振動する電流に対して、高いインピーダンスを示すことが知られている。そこで、CA2 錐体細胞も、元来 3-5 Hz で振動する電流に対して共鳴するかを検討した。

海馬急性切片標本を作製し、パッチクランプ法により、CA2 錐体細胞の膜電位を記録し、正弦波電流を注入した。注入した電流と、それによって引き起こされる膜電位変動から細胞膜のインピーダンスを算出した。特定の入力周波数で振動する電流を注入した際のインピーダンスが大きければ、その細胞膜は元来その入力周波数の電流に応答しやすいことを示す。CA2 錐体細胞に振動性の電流を注入した結果、CA1 錐体細胞とは異なり、3-5 Hz の入力周波数ではインピーダンスのピークが観察されなかった。これにより、細胞膜の固有特性によって、膜電位の 3 Hz の振動は説明できないことが示唆された。

本研究により、海馬 CA2 野は、電気生理学的に不均質なニューロン群から構成され、空間内分布に偏りは無いことが明らかになった。振動性ニューロンと非振動性ニューロンは、発火率や平均静止膜電位、膜抵抗が共通していたが、膜電位の揺らぎという観点で分けることができたと述べている。本研究により発見された、電気生理学的に不均質な細胞集団は互いに異なる機能を持つ可能性がある。本研究は、単一細胞の膜電位という解像度で海馬 CA2 野神経細胞の自発的な神経活動を初めて明らかにし、今後の海馬の電気生理学的研究の礎となることが期待される。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。