

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# 脳梁膨大後部皮質における 神経興奮性の制御

氏 名 高 夢璇

#### 【序論】

脳梁膨大後部皮質（retrosplenial cortex, RSC）は、哺乳動物において共通して存在する大脳皮質の垂領域である。RSC は空間ナビゲーションや感覚情報の処理、エピソード記憶、将来の出来事の想像など、様々な認知機能に関わることが知られている。RSC が海馬支脚（subiculum）や頭頂葉、前頭前野、視床など、多くの脳部位と神経連絡を持つことが報告されていることから、RSC は多様な入力を受け取って情報を統合する「中継」として、様々な脳機能に関与すると考えられている。近年の研究により、海馬において鋭波リップル（sharp wave-ripple, SWR）という記憶の固定化に関連する脳波が生じるとき、RSC が海馬の情報を皮質に伝達する架け橋を担うことが示唆されている。

脳機能を生み出す基盤となるのは、個々の神経細胞が繋がった神経回路である。しかし、RSC においては個々の神経細胞や微小神経回路のレベルの知見が未だに少ない。これまでに、海馬の鋭波リップルが RSC の顆粒性領域（granular RSC, gRSC）において層特異的な応答を引き起こすことが明らかとされてきた。また、gRSC の神経細胞自体も、電流注入に応じて細胞層ごとに活動パターンが異なることが知られている。本研究では、鋭波リップル発生時に神経活動が増大する gRSC の 2/3 層に着目し、これらの神経細胞の電気生理学的特性、および海馬から入力を受け取ったときの応答を解明することを目的とした。

#### 【結果・考察】

##### 1. gRSC 2/3 層の神経細胞はプライミング刺激により発火潜時が短くなる

マウスから急性脳切片を作製し、*in vitro* パッチクランプ法により gRSC 2/3 層の神経細胞からホールセル記録を行った。神経細胞に電流を注入するとともに、細胞の応答として膜電位の変化を計測した。電流注入の開始時刻から、細胞が活動電位（発火）を示すまでの時間は発火潜時と呼ばれ、神経興奮の遅さの指標となる。

gRSC 2/3 層の神経細胞が電流注入に応じて、ランプ状の脱分極と比較的に長い発火

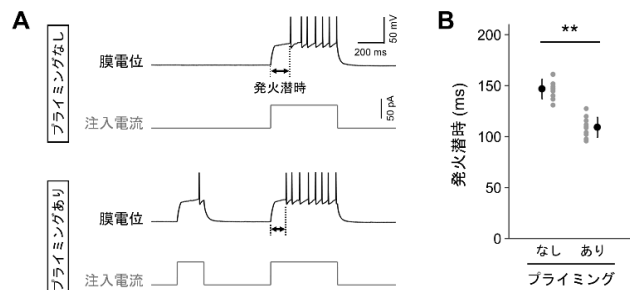


図 1. (A) プライミング刺激を行わないトライアル(上段)と行ったトライアル(下段)における gRSC 2/3 層神経細胞の膜電位変化。(B) それぞれのトライアルを複数回行った際の発火潜時の比較。\*\* $P = 8.5 \times 10^{-8}$ ,  $t_{18} = 8.61$ , Student's *t*-test.

潜時を示し、late-spiking という特性を持つことが知られている（図 1A 上段）。そこで、潜時が細胞の直前の活動によって調節されるかを調べるために、細胞に短い電流を予め注入し（プライミング刺激）、間隔を置いて二回目の電流注入を行った（図 1A 下段）。プライミング刺激を行うことによって、細胞の発火潜時が有意に短くなった（図 1B）。

## 2. gRSC 2/3 層の神経細胞には促進的なプライミング効果が観察される

上記の結果から、gRSC 2/3 層の神経細胞において、先行的な電流注入が細胞の発火潜時を短縮させることを明らかにした。次に、プライミング刺激と後続の刺激との時間間隔を変化させ、発火潜時との関連を調べた（図 2A）。すると、二回の電流注入の間隔が短いほど、発火潜時も短くなる傾向が見られた（図 2B）。

同じプライミング効果がほかの脳領域においても共同的に観察されるかを知るために、gRSC の 5 層および前帯状皮質の 2/3 層、海馬 CA1 野、嗅周皮質の 6 層に対して、同様なプロトコールにより検証を行った。その結果、いずれの脳領域においても、プライミング刺激の存在で神経細胞の発火潜時が長くなる傾向が見られた（図 3）。つまり、先行的な刺激を受けると、神経細胞が自身の興奮性を低下させる方向に自己制御することが一般的であった。したがって、gRSC 2/3 層の神経細胞が独特なプライミング効果を示している。こうした特徴は、細胞に発現するイオンチャネル等の組成に関連する可能性が考えられる。

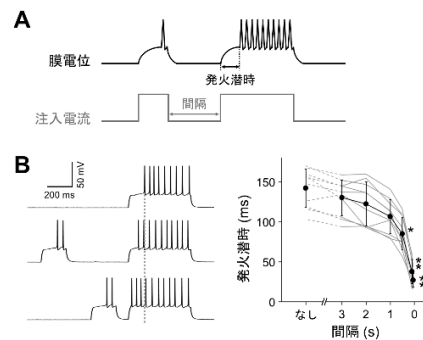


図 2. (A) 電流注入の間隔と発火潜時に関する説明。(B) 間隔が短いほど、細胞の発火タイミングも早まり(左)、潜時が短くなる傾向を示した(右)。ただし、「なし」はプライミングなしの場合を表す。Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  for Dunn's test compared to the control.

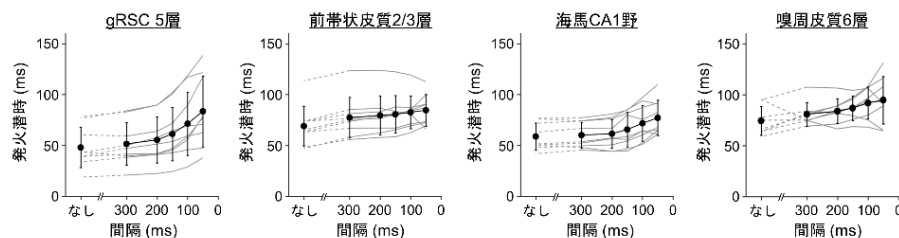


図 3. gRSC 2/3 層のほか、各脳領域における電流注入の間隔と発火潜時との関係。

## 3. 海馬支脚の投射の先行的な活性化は、gRSC 2/3 層の神経細胞を興奮させる

これまでに、プライミング刺激として細胞体に電流を直接注入した。そこで、元々脳内にある神経投射を予め活性化させた場合も、gRSC 2/3 層神経細胞の発火潜時に影響するかを検証した。gRSC 2/3 層に投射を送る海馬支脚にアデノ随伴ウイルス AAV5-CaMKII-ChR2-EYFP を導入し（図 4A）、導入部位の興奮性細胞に ChR2 を発現させたところ、gRSC 2/3 層に海馬支脚から投射される神経終末に ChR2-EYFP のシグナルが観察された（図 4B）。

ChR2 発現の神経終末を活性化させるために、プライミング刺激として青色光のパルス照射を用いた（図 4C）。青色光の照射が gRSC 2/3 層神経細胞に興奮性シナプス後電位（EPSP）を引き起こし、後続の電流注入との間隔が 0.5 秒の場合、発火潜時が有意に短くなった（図 4D）。すなわち、海馬支脚からの投射神経の活性化は、細胞体への電流注入と類似的なプライミング効果を

示すことが分かった。海馬支脚の入力も gRSC 2/3 層の神経細胞を予め興奮させることで、その発火潜時を短縮させる効果があると考えられる。

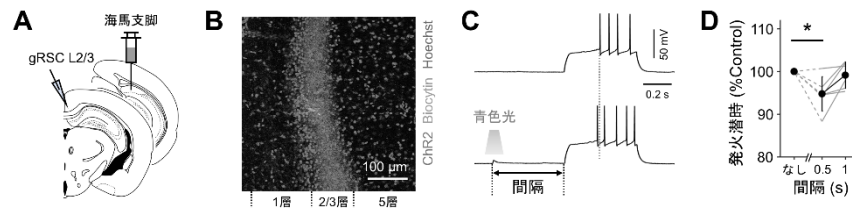


図 4. (A) ウイルスの注入部位 (海馬支脚) とパッチクランプ記録の位置 (gRSC 2/3 層) を示す模式図。(B) 海馬支脚にウイルスを導入した後、gRSC における ChR2 の発現。(C) 青色光照射をプライミング刺激として行った際、gRSC 2/3 層膜電位応答の代表例。(D) 青色光照射と電流注入との間隔を変えたときの発火潜時の比較。ただし、「なし」はプライミングなしの場合 (Control) を表す。 $*P = 0.0104$ ,  $t_4 = 4.55$ , paired  $t$ -test.

#### 4. 海馬支脚の投射の活性化は *in vivo* でも gRSC 2/3 層神経細胞の興奮性を高める

次に、生体内においても gRSC 2/3 層の神経細胞が同様な興奮性調節を受けるかについて検証した。マウスの海馬支脚に ChR2 を導入した後、gRSC 2/3 層神経細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行う同時に、光ファイバーにより海馬支脚に青色光照射を与えた (図 5A)。光照射が gRSC 2/3 層の細胞において膜電位の一過的上昇を引き起こし (図 5B 上段)、また、この膜電位の上昇は光照射を繰り返しても安定して観察された (図 5B 下段)。

海馬支脚に対する光照射は記録細胞の興奮性に影響するかを調べるために、光照射の前後において記録された膜電位から同じ長さの期間を抽出し、膜電位の曲線下面積 (AUC) を比較した (図 5B 上段)。照射の直後では膜電位の AUC が有意に大きくなったことから (図 5C)、生体内においても、海馬支脚からの投射の活性化は、gRSC 2/3 層の神経細胞を興奮状態に向かわせることが示唆された。

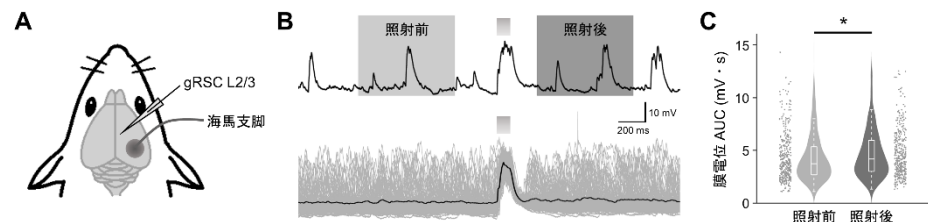


図 5. (A) 実験のパラダイム。(B) 上段: gRSC 2/3 層神経細胞の膜電位が、海馬支脚に対する青色光照射により一過的に上昇した。光照射の前後からそれぞれ膜電位を抽出し、膜電位の曲線下面積 (AUC) を計測した。下段: 青色光照射を複数回行った際の gRSC 2/3 層神経細胞の膜電位変化。各回の膜電位を灰色、全体の平均膜電位を黒色で示した。(C) 青色光照射前後の膜電位 AUC の比較。 $*P = 3.4 \times 10^{-2}$ ,  $t_{758} = 2.12$ , Student's  $t$ -test.

#### 【総括】

本研究では、電気生理学的手法を用いて、gRSC 2/3 層の神経細胞が先行的刺激により発火しやすくなるという独特なプライミング効果を見出した。また、光遺伝学的操作を取り入れ、上流の脳領域である海馬支脚からの投射も、gRSC 2/3 層神経細胞を興奮性上昇の方向に制御することを明らかにした。海馬支脚が海馬からの出力を担う脳領域として知られており、海馬が鋭波リップルといった複数の錐体細胞が同時に活動する高周波振動を示すとき、海馬支脚にも高い確率で神経細胞の同期活動が生じる。こうした神経活動が下流の gRSC まで伝播し、gRSC 2/3 層の神経細胞を一旦興奮させると、今回の結果から、これらの細胞の興奮性がさらに上昇する傾向にあると推測される。したがって、海馬鋭波リップルの発生が gRSC 2/3 層神経細胞の応答性上昇につなが

り、RSC を介した海馬から皮質への情報伝達が促進される可能性がある。本研究で示した gRSC 2/3 層神経細胞の独特な性質は、海馬-皮質間の情報伝達における RSC の役割を説明する足掛かりとなることが期待される。

#### 【参考文献】

Gao, M., Igata, H., Takeuchi, A., Sato, K., Ikegaya, Y. Machine learning-based prediction of adverse drug effects: an example of seizure-inducing compounds. J. Pharmacol. Sci., 133:70-78, 2017.

Gao, M., Orita, K., Ikegaya, Y. Maternal immune activation in pregnant mice produces offspring with altered hippocampal ripples. Biol. Pharmaceut. Bull., 42:666-670, 2019.