

博士論文

マウス海馬CA2野神経細胞の膜電位振動

松本 信圭

目次

1. 序論	3
2. 方法	5
2-1. 動物倫理	5
2-2. 電気生理学 (<i>in vivo</i>)	5
2-3. 電気生理学 (<i>in vitro</i>)	7
2-4. 組織学	8
2-5. データ解析	9
3. 結果	12
3-1. マウス海馬神経細胞からの <i>in vivo</i> パッチクランプ記録	12
3-2. CA2 野錐体細胞と CA1 野錐体細胞の膜固有特性および発火特性	12
3-3. CA2 野錐体細胞の膜電位の特徴的な振動 — 3-Hz 振動の発見	13
3-4. CA2 野の 3-Hz ニューロンの膜固有特性および発火特性	14
3-5. CA2 野における 3-Hz ニューロンの分布の解析	14
3-6. 3-Hz 振動イベントの特徴	15
3-7. 3-Hz 振動と発火との関係	15
3-8. 覚醒マウスにおける 3-Hz 振動	16
3-9. CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動と CA1 野の局所場電位との関係	16
3-10. CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動と膜固有特性との関係	17
4. 図	20
図 1. 本研究の背景と目的	20
図 2. CA2 野錐体細胞からの <i>in vivo</i> パッチクランプ記録	21
図 3. 記録した CA2 野錐体細胞の再構築像	22
図 4. 解析に用いた全ての CA2 野錐体細胞の再構築像	23
図 5. 海馬 CA2 野には 3 Hz の膜電位振動を示す錐体細胞が存在する	24
図 6. CA2 野錐体細胞の半数は 3 Hz の膜電位振動を示す	25

図 7. CA2 野の 3-Hz ニューロンの分布	26
図 8. CA2 野の 3-Hz ニューロンはクラスター化していない	27
図 9. CA2 野の 3-Hz ニューロンの分布に偏りは無い	28
図 10. CA2 野の 3-Hz イベントは間欠的に発生する	29
図 11. 3-Hz イベントの持続時間と時間間隔	30
図 12. 3-Hz イベントにおいては 3-Hz 振動のピークで発火する	31
図 13. 覚醒マウスの CA2 野錐体細胞の膜電位振動	32
図 14. CA1 野でリップル波が発生している間の CA2 野錐体細胞の過分極応答	33
図 15. CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の膜電位の周波数の経時変化	34
図 16. CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の強度の相関	36
図 17. CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞のコヒーレンス (干渉性)	37
図 18. CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞のフーリエスペクトル	38
図 19. CA2 野錐体細胞に対する正弦波電流の注入	39
図 20. CA2 野錐体細胞は 3 Hz の交流電流に共鳴しない	40
5. 考察 -----	40
6. 参考文献 -----	44
7. 謝辞 -----	49

1. 序論

動物の記憶・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。その中でも CA2 野は、CA1 野、CA3 野、歯状回と比較して、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。そのため、CA2 野は、嗅内皮質から歯状回や CA3 野を経由して CA1 野に至る「三シナプス経路」の一部には含まれてこなかった (Andersen et al., 1971)。

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 (Caruana et al., 2012; Jones and McHugh, 2011; Kay et al., 2016)。例えば、CA2 野は攻撃行動 (Pagani et al., 2015) や社会性行動 (Hitti and Siegelbaum, 2014; Piskorowski et al., 2016; Smith et al., 2016) に関与することが明らかになってきている。

また、CA2 野は、乳頭上核や隆起乳頭体核、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 (Amaral and Lavanex, 2007)。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 (Amaral and Lavanex, 2007)。

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橋渡しする、生体動物における電気生理学的知見は限定的である (図 1)。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。例えば、CA2 野の場所細胞の発火特性は CA1 野や CA3 野のそれとは異なることが報告されている (Kay et al., 2016; Alexander et al., 2016; Mankin et al., 2015)。

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、発火がどのように生み出されるのかは明らかにできない。発火は、神経細胞の膜電位が閾値に達することで起こる。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、感覚入力と関連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。

2. 方法

2-1. 動物倫理

実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」および「東京大学動物実験実施規則」に従い、動物実験委員会の承認のもと、動物への苦痛を最小限に抑えるように配慮した（承認番号：P24-8 および P26-5）。

2-2. 電気生理学 (*in vivo*)

細胞内記録 (*in vivo* パッチクランプ記録) は、生後 21-35 日齢の雄性 ICR マウス（日本エスエルシー、静岡、日本）からおこなった。実験手法は、当研究室の先行研究に倣った (Funayama et al., 2015; Ishikawa et al., 2014)。マウスにはカルバミン酸エチルの腹腔内投与 (2.25 g/kg) により全身麻酔を施した。手術部位には 1.0% リドカインの皮下投与により局所麻酔を施し、動物への苦痛を最小限に抑えるように配慮した。麻酔は四肢の引き込み、ひげの動きおよび瞬目反射の消失により確認した。その後皮膚を切開し、手術部位を洗浄した後、金属板を頭蓋骨上に接着した。頭蓋骨には、十字縫合 (bregma) から尾側に 2.0 mm、矢状縫合から腹外側に 2.5 mm の座標を中心に、長方形状 (2.5×2.0 mm² (数値は、吻側から尾側にかけた軸、正中線から側方にかけた軸の順に記載)) の穴を開けた。海馬の直上の大脳新皮質は吸引により除去した (Kuga et al., 2011; Sakaguchi et al., 2012)。海馬の露出により作製された海馬窓 (hippocampal window) は、1.7% のアガロースゲルによって埋めた。アガロースゲルは約 1.5 mm の厚みになるようにした。実験を通して、適宜ヒートパッドを用い、直腸温が約 37°C を維持するように努めた。

細胞内記録に加え、細胞外記録をおこなう際には、十字縫合 (bregma) から尾側に 1.7 mm、矢状縫合から腹外側に 0.4 mm の座標を中心に、長方形状 (2.5×0.5 mm²) の穴を開けた。すなわち、細胞外記録用の穴と細胞内記録用の穴を作製した。

覚醒動物を用いた実験では、ケタミン (50 mg/kg) およびキシラジン (10

mg/kg) の腹腔内投与により全身麻酔を施した後、頭蓋骨への金属板の接着をおこなった。麻酔の確認は上述の方法によりおこなった。手術から二日間の回復期間を置いた後、マウスには頭部固定の馴化トレーニングをおこなわせ、頭部固定時の体動の消失をもとにトレーニングを終了した (Abe et al., 2014)。

電流固定モードでの記録は、背側海馬白板 (海馬槽 : alveus) から 100-550 μm の海馬 CA1 野および CA2 野の神経細胞よりおこなった。

記録電極は、外径 1.5 mm の硼珪酸ガラスのキャピラリーを P-97 プラーによって四段引きにすることで作製した (電極抵抗 : 3.5-6.5 $\text{M}\Omega$)。

電極内液の組成は、グルコン酸カリウム (K-gluconate) 135 mM、塩化カリウム (KCl) 4 mM、4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニエタンスルホン酸 (HEPES) 10 mM、クレアチンリン酸二ナトリウム (Na_2 -phosphocreatine) 10 mM、アデノシン-5'-三リン酸マグネシウム (Mg-ATP) 4 mM、グアノシン-5'-三リン酸二ナトリウム (Na_2 -GTP) 0.3mM、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) 0.3 mM、バイオサイチン (biocytin) 0.2% である。電極内液の pH は約 7.3 になるように調節し、浸透圧は 285-290 mOsm/kg にした。

電気シグナルは MultiClamp 700B により増幅し、pCLAMP10.1 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) で処理した。シグナルは 20 kHz で離散化した。

記録をおこなう前に、神経細胞には -100 pA から +100 pA の 500 ms 長の矩形電流 (20 pA 刻み) を注入し、発火パターンを確認した。発火パターンが regular spiking と分類された神経細胞のみを解析に用いた (図 2)。液界電位は記録後に補正した。直列抵抗 (series resistance) が 75 $\text{M}\Omega$ を超えたデータ、または補正後の平均膜電位が -64 mV を超えたデータは解析から除外した。また、発火のピークが -20 mV を下回ったデータ、または、記録開始時から静止膜電位が 8 mV 以上浅くなったデータも解析から除外した。

局所場電位は CA1 野放線層 (脳表から 1,100-1,500 μm) から記録した。記録には、硼珪酸ガラスの電極を用いた (電極抵抗 : 1.0-3.0 $\text{M}\Omega$)。電極内液として用いた人工脳脊髄液 (aCSF) の組成は、塩化ナトリウム (NaCl) 127 mM、塩化カリウム (KCl) 1.6 mM、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 1.24

mM、硫酸マグネシウム (MgSO_4) 1.3 mM、塩化カルシウム (CaCl_2) 2.4 mM、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 26 mM、グルコース (glucose) 10 mM とした。

CA1 野から局所場電位を記録した部位（電極先端の位置）は、CA2 野から膜電位を記録した部位とは、少なくとも 500 μm 離れていた。局所場電位の波形は、1-400 Hz の帯域通過フィルタをかけた後、独自の MATLAB プログラムによって解析をおこなった。

2-3. 電気生理学 (*in vitro*)

細胞内記録 (*in vitro* パッチクランプ記録) は、生後 21-35 日齢の雄性 ICR マウス（日本エスエルシー、静岡、日本）から作製した急性切片標本からおこなった。イソフルランの吸入によりマウスには麻酔をかけ、素早く断頭し、脳を摘出した。酸素・二酸化炭素混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) により酸素化し、氷冷した薄切用溶液に、摘出脳を浸漬した。摘出脳は浸漬した状態で、ビブラトームを用い水平断面にて 400 μm 厚で薄切した。薄切用溶液 (modified aCSF) の組成は、スクロース 222.1 mM、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 27 mM、リン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4) 1.4 mM、塩化カリウム (KCl) 2.5 mM、塩化カルシウム (CaCl_2) 1 mM、硫酸マグネシウム (MgSO_4) 7 mM、アスコルビン酸 (ascorbic acid) 0.5 mM である (Mizunuma et al., 2014)。

薄切から 30~45 分、切片標本を 35°C にて aCSF 内で回復させた。その後、切片標本を記録チャンバーに静置し、チャンバー内には 35°C の酸素化 aCSF を流速 2 ml/min で灌流した。

記録電極は、外径 1.5 mm の硼珪酸ガラスのキャピラリーを P-97 プラーによって四段引きにすることで作製した（電極抵抗：3.0-6.0 $\text{M}\Omega$ ）。電極内液は、*in vivo* パッチクランプ記録で用いたものと同一のものを使用した。

CA1 野および CA2 野の神経細胞は赤外光微分干渉顕微鏡により視覚的に同定した。神経細胞からは電流注入モードで記録をおこなった。記録開始時には、-100 pA から +240 pA の 500 ms 長の矩形電流 (20 pA 刻み) を注入し、発火パターンを確認した。発火パターンが regular spiking と分類された神経細

胞のみをその後の実験に用いた。チャンバー内は 1 μ M のテトロドトキシンを灌流した。

記録において、一回のセッションは 30 秒とし、異なる周波数の正弦波電流を神経細胞に注入した (Zemankovics et al., 2010)。注入した正弦波電流の振動数と秒数は、1 Hz: 5 秒、2 Hz: 4 秒、3 Hz: 4 秒、4 Hz: 4 秒、5 Hz: 4 秒、10 Hz: 3 秒、20 Hz: 3 秒、40 Hz: 3 秒とした (計 30 秒)。本セッションを 5 回繰り返した。神経細胞の直列抵抗は記録開始時と記録終了時に計測した。直列抵抗が 35 M Ω を超えたデータ、または、記録終了時の直列抵抗が記録開始時のそれよりも 5% 以上増加したデータについては、解析から除外した。

2-4. 組織学

実験後、電極を緩徐に引き上げた (約 1 μ m/s)。マウスは、4% パラホルムアルデヒド溶液 (PFA 溶液) を心臓より灌流することで組織の固定をおこなった後、脳を摘出して PFA 溶液に浸漬し、一晩冷所で保存した。後固定した脳は、ビブラトームを用い、100 μ m 厚の矢状断切片標本作製した。切片標本は、2 μ g/ml streptavidin-Alexa Fluor 594 conjugate (Thermo Fisher Scientific; S11227) と 0.2% Triton X-100 の混合溶液に浸漬し、常温で 6 時間振盪した。その後、細胞体を含まない切片標本については、0.4% NeuroTrace 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain (Thermo Fisher Scientific; N21479) と 0.2% Triton X-100 を含む溶液に浸漬し、一晩常温で振盪した。細胞体を含む切片標本は、1 時間のブロッキングの後、一次抗体としてマウス抗 STEP 抗体 (Cell Signaling Technology; 4396S; 1:500) を含むブロッキング液に浸漬し、4°C で 16 時間振盪した。その後、二次抗体としてヤギ抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific; A-11001; 1:500) と 0.4% NeuroTrace 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain を含む溶液に浸漬し、4°C で 6 時間振盪した。

蛍光画像は、CV1000 共焦点顕微鏡 (横河電機、東京、日本) を用いて取得し、画像取得後、画像処理をおこなった。

2-5. データ解析

データ解析は、MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) を用いておこなった。特に断りのない限り、全てのデータは、平均±標準偏差 (SD) で表示した。有意確率 (P 値) が 0.05 より小さいデータを統計的に有意とした。

記録した神経細胞の膜電位が 3 Hz で振動しているかを検討するために、記録時間全体の膜電位の自己相関関数を求め、その極大値の大きさとチャンスレベルとを比較した。

チャンスレベルの算出は、次のようにおこなった。元の膜電位のトレースを 100 ms の区間に分け、その 100 ms の区間を無作為に並び替え、疑似データを作成した。その疑似データから自己相関関数を求め、相関係数を算出した。その相関係数の平均+6×標準偏差をチャンスレベルとした。

元の波形の自己相関関数において、0.25 秒から 0.5 秒まで (すなわち、2 Hz から 4 Hz まで) における極大値がチャンスレベルを超えていれば、その神経細胞は 3 Hz で膜電位が振動している神経細胞 (3-Hz ニューロン: oscillating neuron) であると定義した。

3-Hz ニューロンのクラスター性を評価するために、CA2 野錐体細胞層 (*stratum pyramidale*) を理想的な長方形として線形的に規格化し、正方形内における個々の神経細胞の相対座標 (0 から 1 まで) を求めた (図 7)。すべてのデータについて、同様に規格化し、3-Hz ニューロンのクラスター性の指標として、幾何学的エネルギー (geometric energy) を次式から算出した (Makino et al., 2016)。

$$\text{Geometric energy} = \sum \frac{z_i z_j}{r_{ij}}, (i \neq j),$$

本式において、各パラメーターは以下のように定めた。

i, j 神経細胞番号

z_i 神経細胞 i が 3-Hz ニューロンであれば 1、そうでなければ 0

r_{ij} 規格化した座標系での神経細胞 i と神経細胞 j のユークリッド距離

解析対象とした全ての CA2 野神経細胞の座標から、3-Hz ニューロンの数だけ座標を選び、合計 1,716 通りの疑似データを作成した。この疑似データの分布の上位 5 % に実データが含まれるかを検討した。

3-Hz ニューロンの分布の非対称性を検討するために、x 座標（CA3 野から CA1 野へ向かう軸における座標）、y 座標（浅層から深層へ向かう軸における座標）のそれぞれについて、歪度（skewness）を算出した。歪度は次式から算出した。

$$\text{Skewness} = \frac{\sum (x_i - m)^3}{N s^3},$$

本式において、各パラメーターは以下のように定めた。

- i 神経細胞番号
- x_i 神経細胞 i の座標（0 から 1 までの実数）
- m 神経細胞の座標の平均値
- s 神経細胞の座標の標準偏差
- N CA2 野の 3-Hz ニューロンの数（すなわち、7）

幾何学的エネルギーと同様に、歪度についても 1,716 個の疑似データを作成し、チャンスレベルを求めた。実データの歪度をチャンスレベルと比較し、歪度の有意性を検討した。

個々の 3-Hz 振動のイベントを同定するために、ウェーブレット変換を用いた。ある時間帯において、2-4 Hz 帯域のウェーブレット係数の絶対値の平均が、1-100 Hz のウェーブレット係数の絶対値の平均+2×標準偏差を超えていれば、その時間帯は「3-Hz 振動イベント」とであると定義した。同様に、ある時間帯において、30-90 Hz 帯域のウェーブレット係数の絶対値の平均が、1-100 Hz のウェーブレット係数の絶対値の平均+2×標準偏差を超えていれば、その時間帯は「ガンマ振動イベント」とであると定義した。

細胞外記録によるリップル波の検出は、次の手順でおこなった。まず、局所場電位のトレースに 150-250 Hz の帯域通過フィルタをかけた。次に、ベースラインの電位変動の標準偏差の 6 倍の値を閾値とし (Mizunuma et al., 2014)、その閾値を超えた電位変動をリップル波とした。自動検出されたイベントのうち、偽陽性のイベントは、検出後に手動で排除した。

膜電位の 3-Hz 振動に対する、時刻 t の発火の位相は、次のように求めた。まず、3-Hz ニューロンの膜電位のトレースに 2-4 Hz の帯域通過フィルタをかけた。次に、フィルタをかけたトレースにおける周期的な振動のピークを求めた。そして、そのようなピークのうち、対象とした時刻 t の直前のピークの時刻を t_1 、直後のピークの時刻を t_2 とした。発火の位相は、度数法で表し、 $360 \times (t - t_1) / (t_2 - t_1)$ により求めた (Harvey et al., 2009)。

角度 $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_n$ の平均角度 θ は、ベクトルを用いて次のようにして求めた。まず、点 O を原点とする x - y 直交座標系において、点 $P_1(\cos\theta_1, \sin\theta_1)$ を定め、角度 θ_1 を $\overrightarrow{OP_1}$ とみなした。同様に、 $\theta_2, \dots, \theta_n$ についても、 $\overrightarrow{OP_2}, \dots, \overrightarrow{OP_n}$ を求めた。

次に、平均合成ベクトル $\overrightarrow{OP} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \overrightarrow{OP_i}$ を求めた。これを満たす点 $P(\cos\theta,$

$\sin\theta)$ から、 θ を算出した。角度の標準偏差 σ_θ は、 $\sigma_\theta = \sqrt{-2 \ln |\overrightarrow{OP}|}$ から求めた。

ただし、 $0 \leq |\overrightarrow{OP}| \leq 1$ である。

3. 結果

3-1. マウス海馬神経細胞からの *in vivo* パッチクランプ記録

麻酔下のマウスの背側海馬 CA2 野神経細胞からパッチクランプ記録をおこなった (図 2)。63 匹のマウスから記録を試み、44 匹のマウスより 54 の神経細胞から whole-cell 記録をおこなった。

記録後には、記録した神経細胞を再構築し、位置と形態を確認した。確認のために用いた手法は次のとおりである。予め電極内液にはバイオサイチン (ビオチン化したリジン) を入れておき、記録中に、細胞内にバイオサイチンを受動拡散させた。記録後、電極は緩徐に引き抜き、マウスを灌流固定した後、一日の後固定を経て、切片標本作製した。その後、streptavidin-Alexa Fluor 594 conjugate を用いて、記録した神経細胞を可視化した。さらに、CA2 野のマーカータンパク質である STEP (Kohara et al., 2014) による免疫染色と NeuroTrace による神経細胞の染色をおこなった (図 3)。これにより、記録した神経細胞の位置が CA2 野であるか否かを判定した。記録した神経細胞の位置が CA1 野か CA3 野かは、錐体細胞層のうち STEP により染色された領域をもとに判定した。また、海馬支脚と CA1 野の境界は、CA1 野の密な錐体細胞層が終わる部分とした。歯状回は顆粒細胞層を含む領域として同定した。

記録した 54 の神経細胞のうち、53 の神経細胞の再構築に成功した (98.1%)。内訳は、CA2 野の錐体細胞が 15 (図 4)、CA2 野のインターニューロン (抑制性神経細胞) が 2、CA1 野の錐体細胞が 28、CA1 野のインターニューロンが 3、部位が同定できなかった神経細胞が 5 であった。電気生理学の実験結果の質を担保するため、データの採用基準を満たした 12 の CA2 野錐体細胞と 22 の CA1 野錐体細胞の測定結果を解析した。

3-2. CA2 野錐体細胞と CA1 野錐体細胞の膜固有特性および発火特性

電流固定下で膜電位の記録をおこなった。以下の数値データは、CA2 野錐体細胞、CA1 野錐体細胞の順に平均値±標準誤差 (SEM) の形式で記載する。また、例数は CA2 野錐体細胞が 12、CA1 野錐体細胞が 22 である。用いた検定

は全て、Student's *t*-test である。

平均静止膜電位はそれぞれ、 -66.1 ± 0.8 mV、 -68.1 ± 1.1 mV であった ($P = 0.23$, $t_{32} = 1.23$)。自発発火率は、 0.81 ± 0.35 Hz、 1.07 ± 0.43 Hz ($P = 0.69$, $t_{32} = 0.40$)。膜抵抗は、 71.7 ± 16.8 M Ω 、 77.8 ± 9.8 M Ω であった ($P = 0.75$, $t_{32} = 0.32$)。どのパラメーターも CA2 錐体細胞と CA1 錐体細胞との間に有意な差は認められなかった。

3-3. CA2 野錐体細胞の膜電位の特徴的な振動 — 3-Hz 振動の発見

膜電位の観察の結果、一部の CA2 錐体細胞の閾値下膜電位は、周期的に振動していることを発見した (図 5A)。個々の神経細胞の膜電位の振動を特徴づけるために、記録時間全体における膜電位振動の自己相関関数を求めた。一部の CA2 錐体細胞の自己相関関数は周期的にピークを持ち、特に、0.25-0.5 秒 (周波数としては 2-4 Hz に対応する) においてピークを持っていた (図 5A)。一方、他の錐体細胞は顕著な膜電位振動を示さなかった (図 5B)。

統計学的に、このような 3 Hz の閾値下膜電位の振動 (以下、「3-Hz 振動」) を評価するために、自己相関関数の周期的なピークをチャンスレベルと比較した。ある CA2 野錐体細胞の膜電位に関して、元の自己相関関数の 0.25-0.5 秒におけるピークがチャンスレベルを超えていれば、その錐体細胞は「3-Hz ニューロン」であると定義した (図 5)。

この定義により分類した結果、12 の CA2 野錐体細胞のうち 7 つ (58.3%) が 3-Hz ニューロンであった。一方、22 の CA1 野錐体細胞のうち、4 つ (18.2%) が 3-Hz ニューロンであった (図 6)。CA2 野の 3-Hz ニューロンの比率は、CA1 野のそれよりも有意に高かった (odds ratio = 6.30, $P = 0.026$, Fisher's exact test)。

CA2 野と CA1 野の 3-Hz ニューロンの閾値下膜電位の平均周波数は、それぞれ 3.1 ± 0.7 Hz と 3.1 ± 0.2 Hz であり、両者に有意な差は認められなかった ($P = 0.96$, $t_9 = 0.05$, Student's *t*-test)。

以降は、CA2 野の 3-Hz ニューロンに注目して、解析を進めた。

3-4. CA2 野の 3-Hz ニューロンの膜固有特性および発火特性

CA2 野の 3-Hz ニューロンと非 3-Hz ニューロンについて、膜固有特性および発火特性を比較した。以下の数値データは、3-Hz ニューロンと非 3-Hz ニューロンの順に、平均値 \pm 標準偏差の形式で記載する。また、例数は 3-Hz ニューロンが 7、非 3-Hz ニューロンが 5 である。用いた検定は全て、Student's *t*-test である。

平均静止膜電位は、 -67.4 ± 3.0 mV、 -64.3 ± 0.8 mV であった ($P = 0.069$, $t_{10} = 2.04$)。膜抵抗は、 69.0 ± 57.9 M Ω 、 75.5 ± 58.8 M Ω であった ($P = 0.87$, $t_{10} = 0.17$)。自発発火率は、 1.17 ± 1.44 、 0.30 ± 0.38 Hz であった ($P = 0.25$, $t_{10} = 1.20$)。

3-5. CA2 野における 3-Hz ニューロンの分布の解析

CA1 野では、CA1 野錐体細胞層の浅層と深層の錐体細胞に機能の差が見られる (Mizuseki et al., 2011; Danielson et al., 2016)。このことから、今回発見した 3-Hz ニューロンの分布も CA2 野錐体細胞層内で偏っている可能性を検証した。

3-Hz ニューロンの分布パターンを定量するために、3-Hz ニューロンの位置について、クラスター性や空間的非対称性を検討した。

まず、クラスター性を評価するために、CA2 野錐体細胞層を理想的な長方形として線形的に規格化し、正方形内における個々の神経細胞の相対座標 (0 から 1 まで) を求めた (図 7)。幾何学的エネルギー (geometric energy) を求めた (Makino et al., 2016)。幾何学的エネルギーが大きいほど、クラスター性が高いことを示す。実データから 1,716 の疑似データを作製し、それぞれの疑似データの幾何学的エネルギーを求め、ヒストグラムとして表した。そして、実データの幾何学的エネルギーを求め、このヒストグラムと比較することで、チャンスレベルに比べて有意に高い幾何学的エネルギーを持つかを調べた (図 8)。結果、実データの幾何学的エネルギーとチャンスレベルとの間に有意な差は認められなかった。

次に、空間的非対称性を評価するために、歪度を求めた。歪度の絶対値が大きいほど、分布が偏っていることを示す。CA3 野から CA1 野に向かう軸

(水平軸) と浅層から深層に向かう軸 (垂直軸) について歪度を計算し、幾何学的エネルギーの解析と同様に、チャンスレベルと実データとを比較した。水平軸方向の歪度 (図 9 左) はチャンスレベルと有意な差は認められなかった ($P=0.39$)。また、垂直軸方向の歪度 (図 9 右) も、チャンスレベルと有意な差は認められなかった ($P=0.37$)。

CA1 野では、4 つの 3-Hz ニューロンのうち、2 つが CA1 野錐体細胞の浅層に、残りの 2 つが深層に存在していた。

これらのことから、CA2 野錐体細胞層においても、CA1 野錐体細胞層においても、3-Hz ニューロンの分布に空間的な偏りは無いことが示された。

3-6. 3-Hz 振動イベントの特徴

ウェーブレット変換を用いて、膜電位の 3-Hz 振動の時間的特徴を解析した (図 10)。スペクトルにおいて、疑似カラーで表示したウェーブレット係数の絶対値 (以下、「ウェーブレット強度」とする) は約 3 Hz において顕著であった。しかし、ウェーブレット強度は、必ずしも常に 3 Hz で最大ではなかった。すなわち、3-Hz 振動は時間的に分断されていた。このことから、ウェーブレット強度をチャンスレベルと比較することで、統計学的に、3-Hz 振動が起きている時間帯を検出し、「3-Hz 振動イベント」と定義した。7 つの 3-Hz ニューロンから、3-Hz 振動イベントの発生頻度と持続時間を算出した。3-Hz 振動イベントの発生頻度は、一分あたり 8.8 ± 3.3 回であり (図 11 上)、ひとつのイベントの持続時間は 5.9 ± 11.5 秒であった (図 11 下)。

3-7. 3-Hz 振動と発火との関係

7 つの 3-Hz ニューロンの膜電位をもとに、3-Hz 振動イベント中、および 3-Hz 振動イベント外での発火率を計算した。前者は、 1.21 ± 1.44 Hz であり、後者は、 1.20 ± 1.43 Hz であった。両者に有意な差は認められなかった ($P=0.97$, $t_6=0.04$, paired t -test)。

3-Hz 振動イベント中の、3-Hz 振動に対する発火の位相は $352^\circ \pm 45^\circ$ であった。3-Hz 振動イベントにおいて、発火は 3-Hz 振動のピーク (0°) に有意に

集まっていることが示唆された ($P < 0.0001$, $V_{1,090} = 34.1$, V -test versus 0°) (図 12)。

3-8. 覚醒マウスにおける 3-Hz 振動

ここまでは麻酔下のマウスを用いて検討を重ねてきたが、次に頭部固定下の覚醒マウスを用いて、同様の検討をおこなった。27 匹の覚醒マウスから記録を試み、ひとつの CA2 野神経細胞から閾値下膜電位の記録をおこなうことに成功した。

麻酔下での記録と同様に、3-Hz 振動イベントを定義すると、覚醒下での記録においても 3-Hz 振動イベントは断続的に発生していた (図 13)。しかし、麻酔下における 3-Hz 振動ほどの安定性は無く、3-Hz ニューロンとは定義できなかった。

3-9. CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動と CA1 野の局所場電位との関係

3-Hz 振動と海馬内の局所ネットワークとの関係を検討するため、CA2 野神経細胞の膜電位と、CA1 野の局所場電位の同時記録を試み、二匹のマウスから一細胞ずつ成功した (図 14A)。他の研究グループからの報告と同様に (Valero et al., 2015)、CA1 野でのリップル波の発生中には、CA2 野神経細胞は平均して一過性の過分極を示した (図 14B, C, $n = 43$ events from 2 neurons)。観察された全てのリップル波のうち、 $88.2 \pm 11.8\%$ が CA2 野神経細胞の過分極を伴っていた (mean \pm SD of 2 cells)。CA2 野神経細胞の 3-Hz 振動イベント中であっても、3-Hz 振動イベント外であってもリップル波は発生しており、全 43 のリップル波のうち 35% は 3-Hz イベント中に発生していた ($P = 6.72 \times 10^{-2}$, $Z = 1.83$, Z -test for a proportion versus 50%)。3-Hz 振動イベント中における、リップル波のピークの位相を算出した。膜電位の 3-Hz 振動に対するリップル波の位相は $170^\circ \pm 62^\circ$ であり、3-Hz 振動のトラフ (180°) に有意に集まっていた ($P < 0.005$, $V_{15} = 2.98$, V -test versus 180°)。

次に、CA1 野の局所場電位から統計学的に 3-Hz 振動の成分を抽出した。以降では、CA1 野の局所場電位の 3-Hz 振動成分を、LFP-3-Hz 振動と呼ぶ。

LFP-3-Hz 振動に対する CA2 野神経細胞の発火の位相を算出した。平均位相は $151^\circ \pm 102^\circ$ であり、LFP-3-Hz 振動のトラフに有意に集まっていた ($P < 0.0001$, $V_{352} = 4.83$, $V\text{-test versus } 180^\circ$)。

一方、CA2 野神経細胞の 3-Hz 振動と、CA1 野の局所場電位との相関を、(i) ウェーブレット変換 (図 15B)、(ii) ウェーブレット・コヒーレンス (図 15C)、(iii) ウェーブレット強度の相関係数 (図 16)、(iv) コヒーレンス (図 17)、(v) 高速フーリエ変換 (図 18) により検討した。

ウェーブレット・コヒーレンスによる解析では、時間が進むにつれて、ウェーブレット強度により求まる位相差が不安定であることが示された。また、コヒーレンスによる解析では、二細胞について 0.1 を下回っていた。さらに、高速フーリエ変換による解析では、二細胞共に、3 Hz においてピークは重ならなかった。

これらのことから、CA2 野神経細胞の 3-Hz 振動と、CA1 野の局所場電位とは相関が無いことが示された。

加えて、CA2 野神経細胞の膜電位振動が CA1 野の局所場電位のガンマ波成分 (30–90 Hz) と関連があるかを検討した。しかし、両者に有意な相関は認められなかった。

以上のことから、本研究で発見された CA2 野神経細胞の 3-Hz 振動は、海馬全体のネットワークを反映しているのではないことが示唆された。寧ろ 3-Hz 振動は、CA2 野内で発生する局所的な神経活動、または、海馬外から CA2 野に投射する神経核の活動を反映している可能性が考えられる。

3-1 0. CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動と膜固有特性との関係

最後に、急性海馬切片標本を用い、*in vitro* パッチクランプ記録により、CA2 野の 3-Hz 振動と膜固有特性との関連を検討した。1 μM のテトロドトキシン (電位依存性 Na^+ チャネル阻害薬) を細胞外液に灌流し、発火を抑制した状態で、CA2 野および CA1 野神経細胞から膜電位の記録をおこなった。続いて、1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40 Hz の入力振動数 (input frequency) を持つ正弦波電流を神経細胞に注入し、特定の入力振動数に対して、膜電位が共振するか否

かを検討した（図 19）。

ここで、神経細胞の生物物理に触れ、神経細胞の細胞膜で見られる共振の性質と、インピーダンスの算出方法を述べる。

細胞膜を構成するリン脂質二重膜は、親水基によって疎水基を挟み込む構造であり、生物物理学的には、二枚の極板で絶縁体を挟んだコンデンサーと捉えることができる。また、電荷を運びたイオンを通すイオンチャネルは生物物理学的に抵抗と捉えることができる。すなわち、多数のイオンチャネルを発現している神経細胞の細胞膜は、電気回路として、抵抗とコンデンサーを並列につなげた RC 並列回路とみなすことができる。そして、このチャネル（抵抗）とリン脂質二重膜（コンデンサー）が細胞膜の膜固有特性を決めている。

物理学的には、この RC 並列回路に対して、外部から振動数 ω の交流電流をかけると、交流電流に遅れて電位は変化する。これらをもとに、この RC 並列回路の合成インピーダンスを次の式①から求めることができる。

$$Z = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2}} \quad \dots \textcircled{1}$$

式①において、各パラメーターは以下のように定めた。

Z 合成インピーダンスの絶対値 ($M\Omega$)

R 神経細胞の膜抵抗 ($M\Omega$)

C 神経細胞の膜容量 (pF)

ω 交流電流の振動数 (Hz)

さて、式①において、神経細胞の細胞膜が単純な RC 並列回路であれば、 R と C は記録時間中不変であると考えられる。なぜなら、 R はイオンチャネルの密度やイオン透過性に依存し、 C はリン脂質二重膜の厚み（物理学では、極板間距離に相当する）や神経細胞の表面積に依存するためである。すなわち、通常の神経細胞では、 Z の大小は ω の大小に依存する。

しかし、CA1 野錐体細胞においては、 ω の単調増加に伴って Z は単調減少せず、 ω が約 3 の時に Z は最大となることが知られている (Zemankovics et al., 2010)。すなわち、CA1 野錐体細胞の細胞膜は 3 Hz の交流電流に対して共振

し、この性質は式①だけでは説明できない。これは、CA1 錐体細胞に発現している HCN1 チャネルの寄与と考えられている。

このような特性が CA1 野錐体細胞では見られるため、膜抵抗と膜容量から合成インピーダンスを見積もる方法は適切ではない。よって、実験的には、例えば、1 Hz の交流電流を神経細胞に注入した場合には、高速フーリエ変換を用いて、注入電流の 1 Hz の強度と膜電位変動の 1 Hz の強度を求め、後者を前者で除することでインピーダンスを求めた。そして、インピーダンスを膜固有特性の指標とし、 ω の増加に伴って、インピーダンスが極致を持つ（共振する）か否かを検討した。

上記の方法により、CA2 野および CA1 野錐体細胞のインピーダンスを算出した。CA2 野錐体細胞では、どの入力振動数においても、インピーダンスが極大値を取ることはなく、入力振動数の増加に伴い、インピーダンスは減少した（図 20 左）。一方、CA1 野錐体細胞では、およそ 2-4 Hz の入力振動数において、インピーダンスが極大となった（図 20 右）。これは、先行研究（Zemankovics et al., 2010）とも一致する結果である。

これらのことから、CA1 野錐体細胞に対して、CA2 野錐体細胞は、膜固有特性として、3 Hz の入力振動数に共振する性質を持たないことが示された。

4. 図

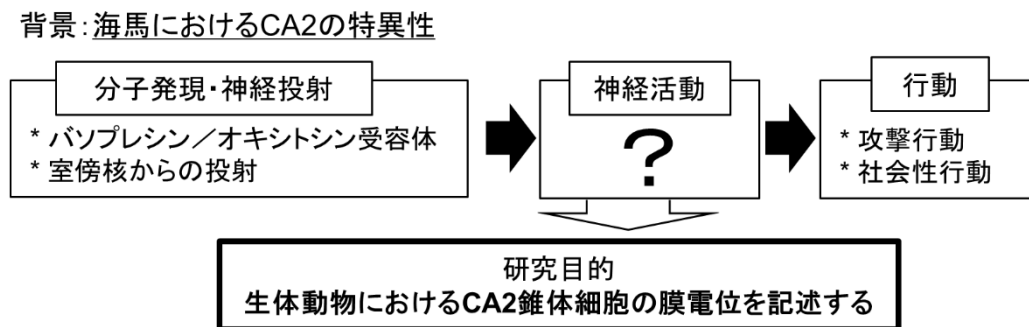


図1 本研究の背景と目的

海馬 CA2 野は、受容体の発現や他の脳領域からの神経投射の観点から独特である。また、動物の行動においても、攻撃行動や社会性行動に関与し、海馬のその他の亜領域とは一線を画している。しかし、これらをつなぐ電気生理学的知見は皆無であった。

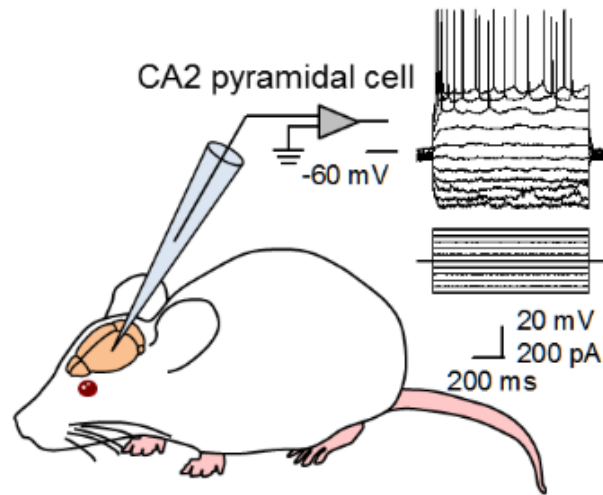


図2 CA2 野錐体細胞からの *in vivo* パッチクランプ記録
麻酔下のマウスから、CA2 野錐体細胞の膜電位を記録し、記録電極よりバ
イオサイチンを拡散させた。

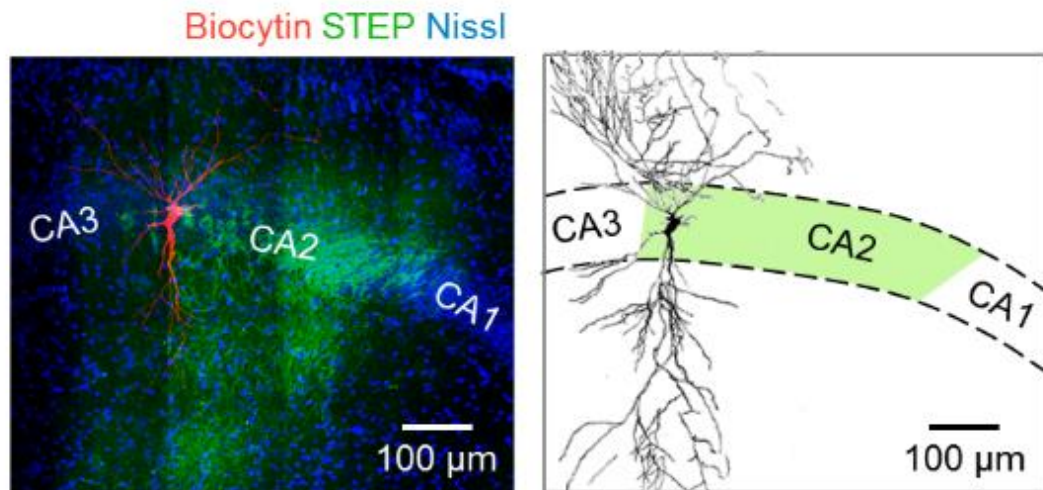


図3 記録したCA2野錐体細胞の再構築像

左：記録した神経細胞（赤）を再構築し、共焦点顕微鏡により可視化した。切片は抗STEP抗体（緑）を用いてCA2野を同定し、神経細胞（青）をNeuroTraceにより染色した。右：神経細胞の形態をトレースした。

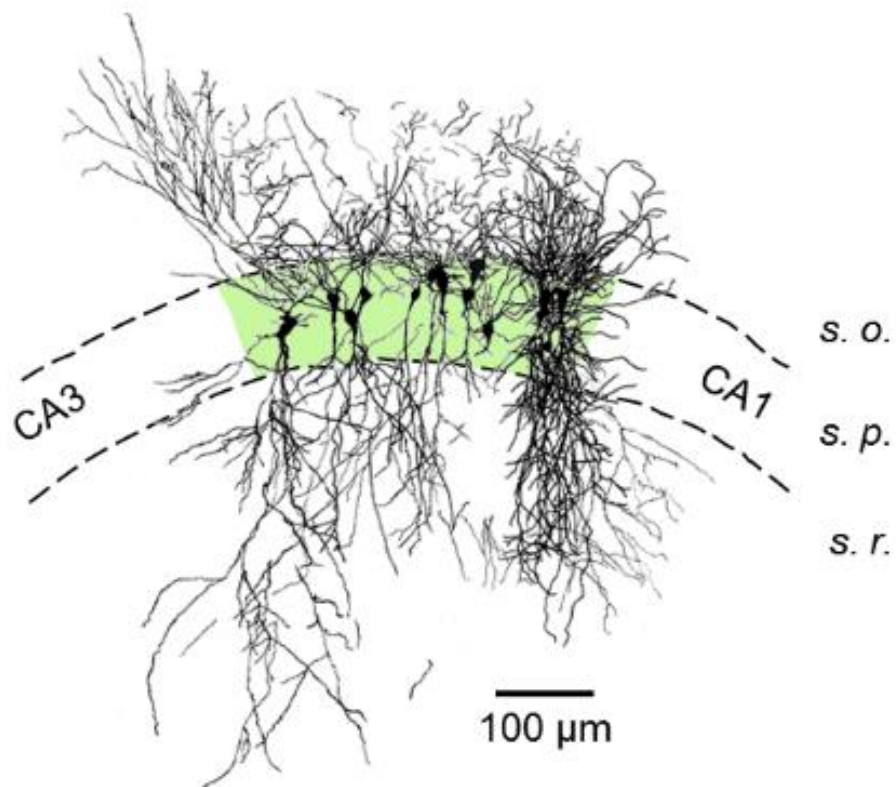


図 4 解析に用いた全ての CA2 野錐体細胞の再構築像

本論文で解析に用いた全 16 個の CA2 野錐体細胞を、錐体細胞層内で重ね合わせた。

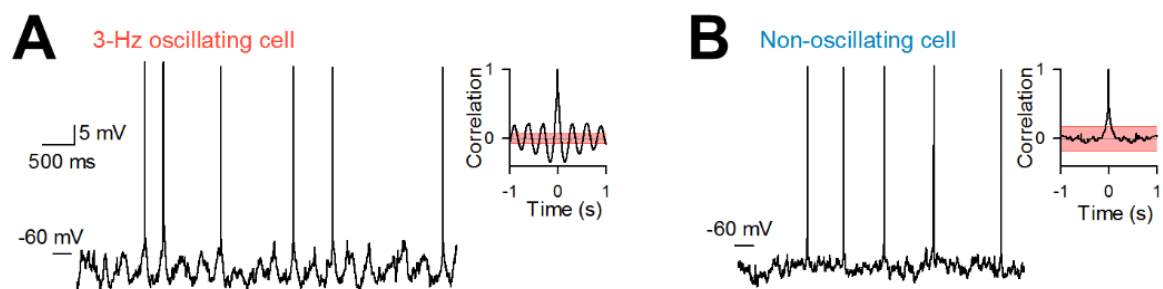


図5 海馬 CA2 野には 3 Hz の膜電位振動を示す錐体細胞が存在する

A. 3 Hz で膜電位振動する CA2 野錐体細胞（3-Hz ニューロン）の膜電位の代表トレース。記録時間全体の膜電位の自己相関関数と 95%信頼区間（赤）。

B. 3 Hz で膜電位振動しない CA2 野錐体細胞（非 3-Hz ニューロン）の膜電位の代表トレース。記録時間全体の膜電位の自己相関関数と 95%信頼区間（赤）。

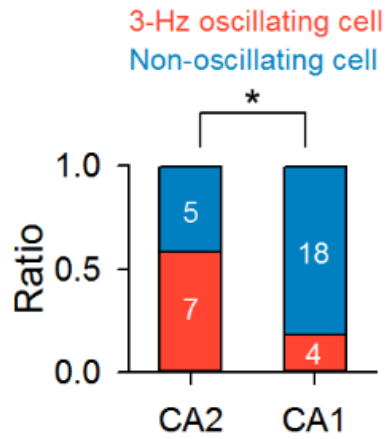


図6 CA2 野錐体細胞の半数は 3 Hz の膜電位振動を示す
 CA2 野および CA1 野における 3-Hz ニューロン（赤）と非 3-Hz ニューロン（青）の存在比。グラフ上の数字は神経細胞数を表す（* $P = 0.026$, Fisher's exact test）。

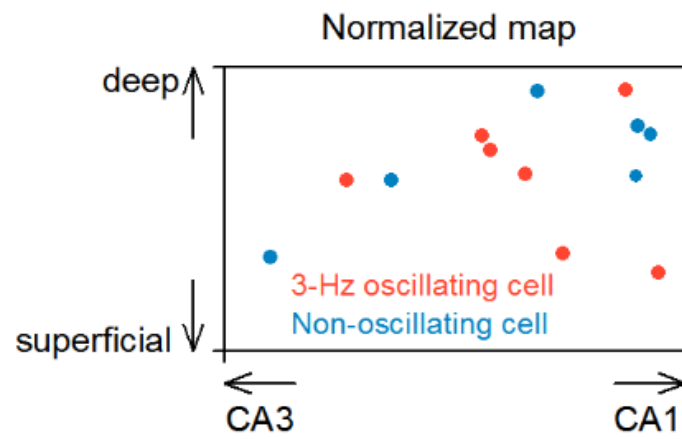


図7 CA2 野の 3-Hz ニューロンの分布

規格化した CA2 野錐体細胞層内における、3-Hz ニューロン（赤）と非 3-Hz ニューロン（青）の細胞体の位置。

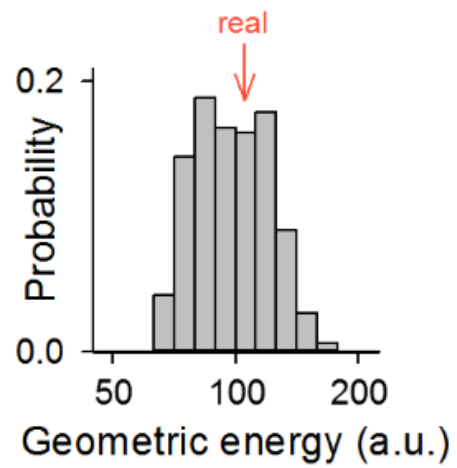


図 8 CA2 野の 3-Hz ニューロンはクラスター化していない
3-Hz ニューロンの幾何学的エネルギー (クラスター性の指標) を求め (real)、
疑似データの幾何学的エネルギーの分布と比較した。

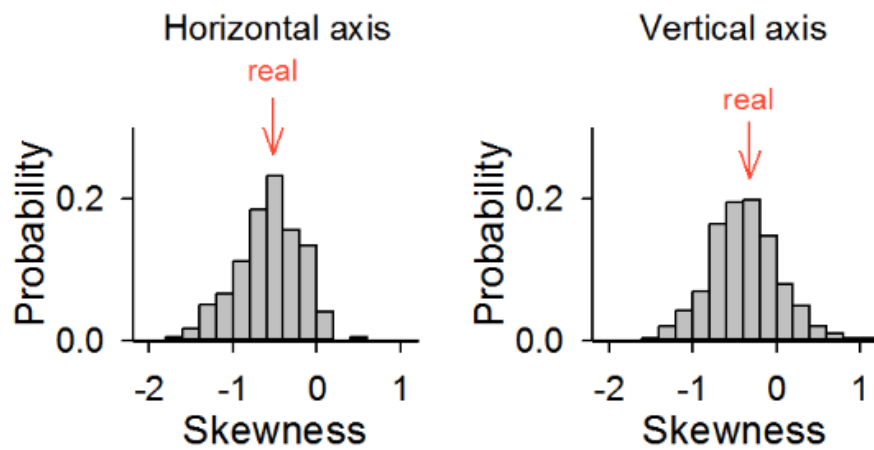


図9 CA2 野の 3-Hz ニューロンの分布に偏りは無い

左：CA3 から CA1 へ向かう軸（horizontal axis）について、3-Hz ニューロンの歪度（real）と、疑似データの歪度のヒストグラムを求めた。

右：浅層から深層へ向かう軸（vertical axis）について、3-Hz ニューロンの歪度（real）と、疑似データの歪度のヒストグラムを求めた。

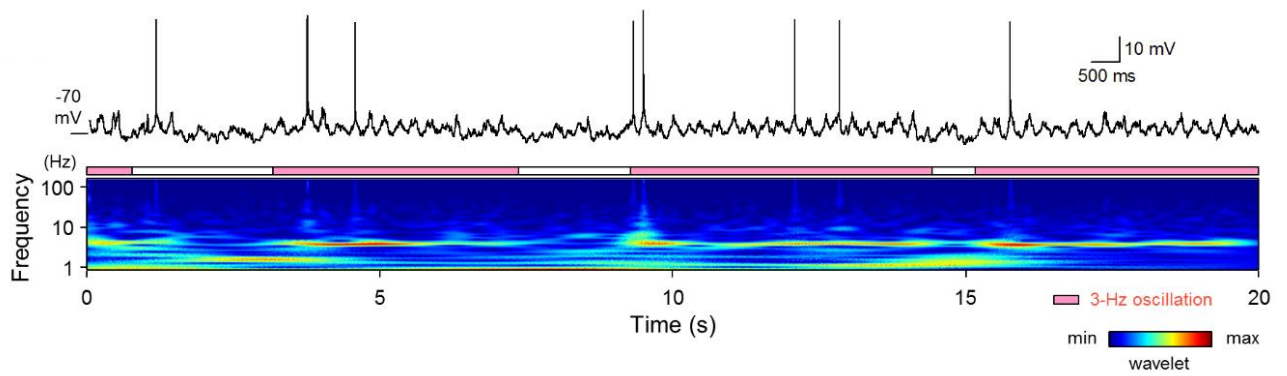


図 10 CA2 野の 3-Hz イベントは間欠的に発生する

上：CA2 野の 3-Hz ニューロンの膜電位の代表トレース。

下：上の膜電位のトレースをウェーブレット変換し、疑似カラー表示した。

3-Hz 帯域の強度が他の帯域よりも有意に大きい時間帯を 3-Hz イベントと定義し、桃色で示した。

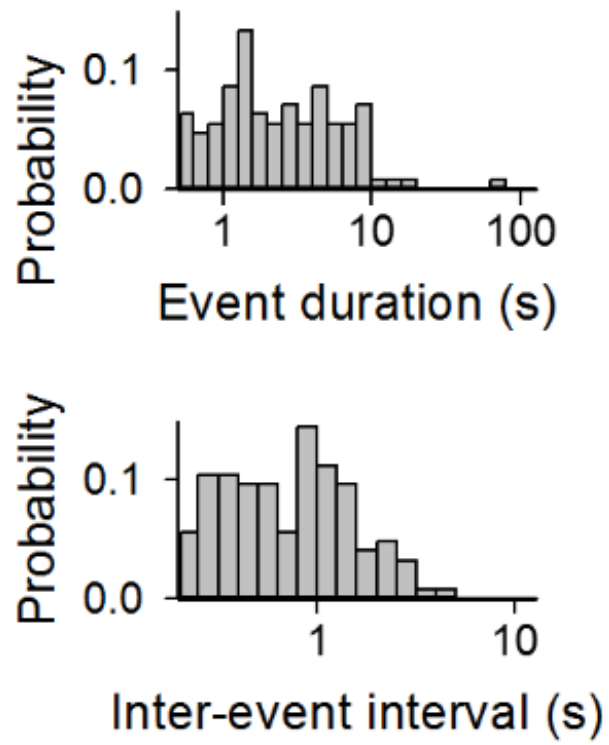


図 11 3-Hz イベントの持続時間と時間間隔

上：3-Hz イベントの持続時間の分布 ($n = 127$ events from 7 oscillating cells)。

下：3-Hz イベント間の時間間隔の分布。

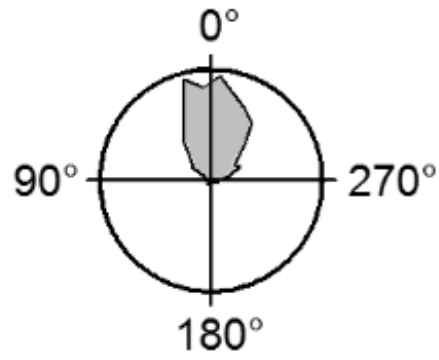


図 12 3-Hz イベントにおいては 3-Hz 振動のピークで発火する
3-Hz 振動中の発火の位相の確率密度分布 ($n = 1,090$ spikes in 7 oscillating cells)。

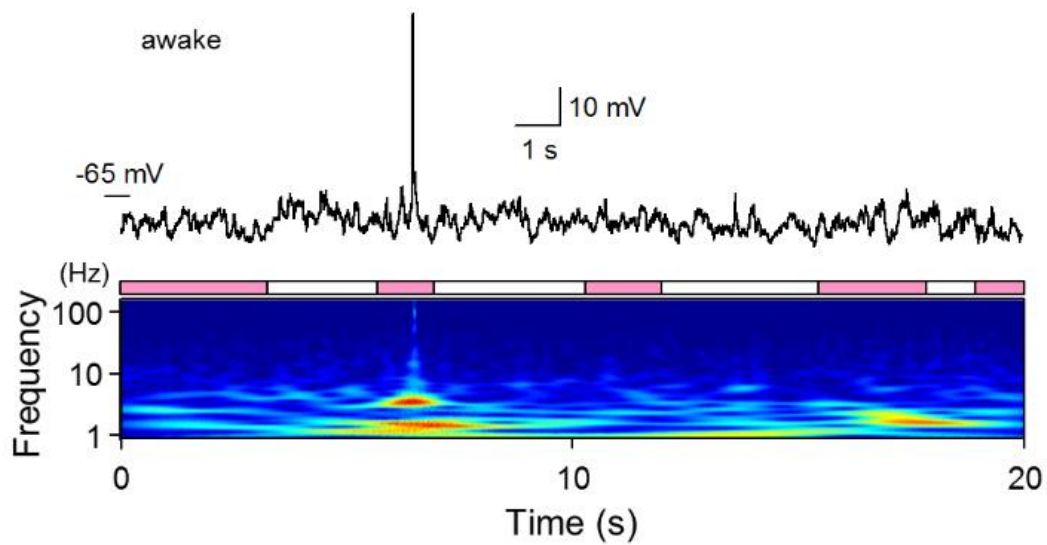


図 13 覚醒マウスの CA2 野錐体細胞の膜電位振動

上：覚醒マウスにおける CA2 野錐体細胞の膜電位の代表トレース。

下：上の膜電位のトレースをウェーブレット変換し、疑似カラー表示した。
3-Hz 帯域の強度が他の帯域よりも有意に大きい時間帯を 3-Hz イベントと定義し、桃色で示した。

図の見方は図 10 と同様である。

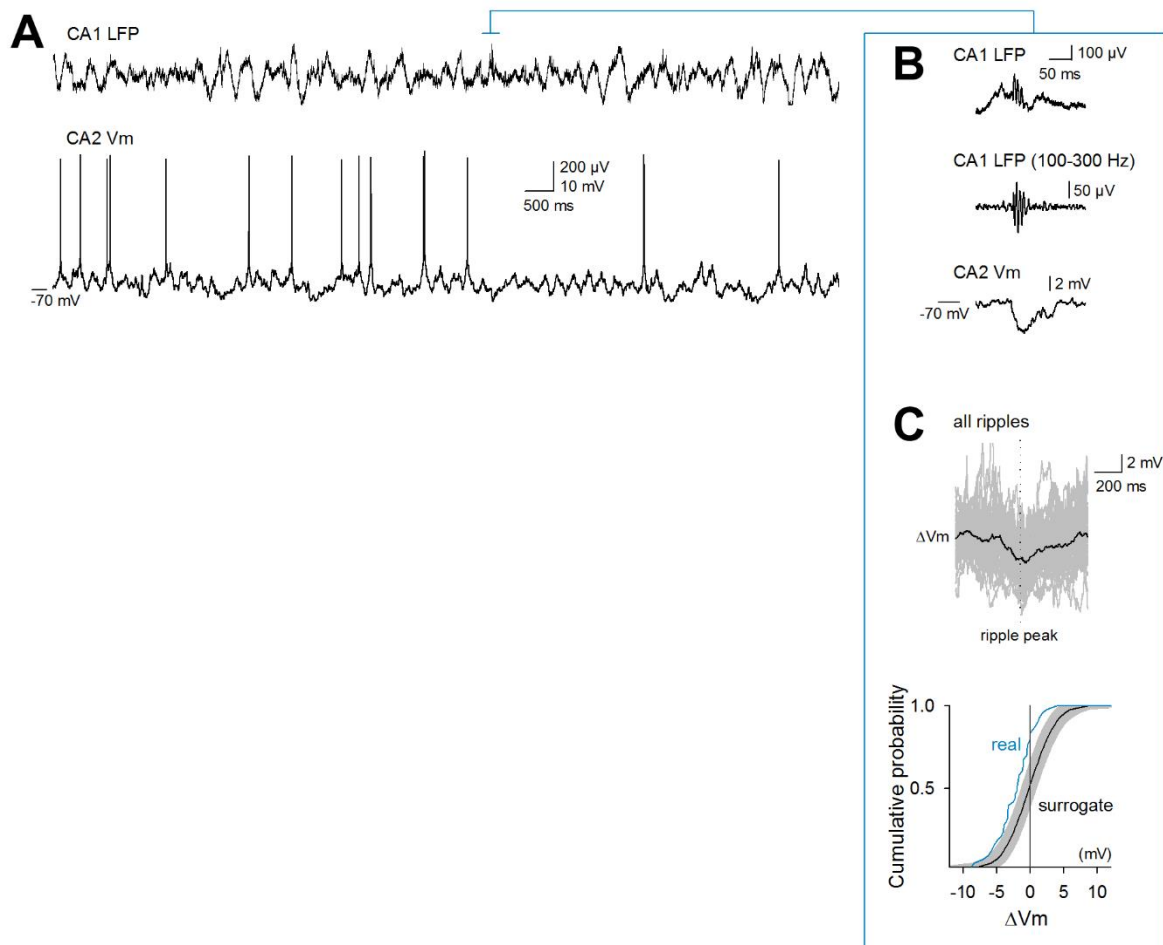


図 14 CA1 野でリップル波が発生している間の CA2 野錐体細胞の過分極応答

A. CA1 野の局所場電位（上）と CA2 野錐体細胞の膜電位（下）の同時記録。

B. CA2 野錐体細胞は、CA1 野のリップル波発生中に一過的な過分極を示す。その代表トレース。

C. 上: 全 43 個のリップル波における CA2 野錐体細胞の膜電位変化の平均 (黒) を、個々の膜電位変化のトレース (灰色) に重ねて表示した。下: 43 個のリップル波における膜電位変化の累積確率曲線 (青)、および、その疑似データの累積確率曲線 (黒) と疑似データの 95% 信頼区間 (灰色)。全体として、CA2 野錐体細胞は、CA1 野のリップル波において、過分極していることが示唆される。

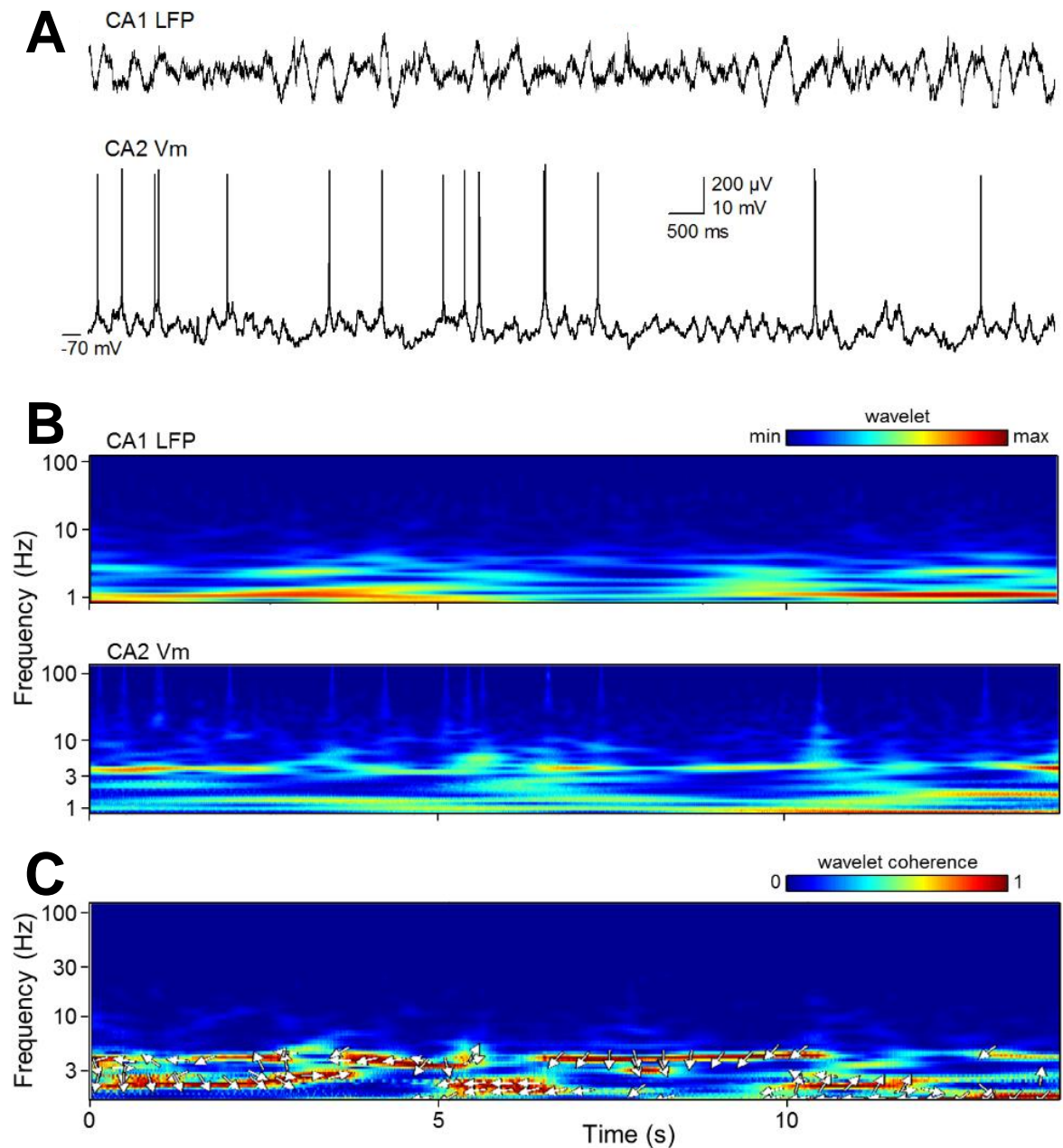


図 15 CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の膜電位の周波数の経時変化
A. CA1 野の局所場電位（上）と CA2 野錐体細胞の膜電位（下）の同時記録（図 14A を再掲）。

B. A で示した二つのトレースをウェーブレット変換し、疑似カラー表示した。

C. A で示した二つのトレースのウェーブレット・コヒーレンスを疑似カラー表示した。ウェーブレット・コヒーレンスが 0.5 を超える部分については、両トレースの相対位相差を白矢印で示した（相対位相差が 0° または 90° の場合、それぞれ、右向きまたは上向きの矢印で相対位相差を示した）。ウェー

ブレット・コヒーレンスは大きい値をとる（暖色）こともあるが、矢印の方向は経時変化に応じてばらついている。つまり、ウェーブレット・コヒーレンスは不安定であることが示唆される。

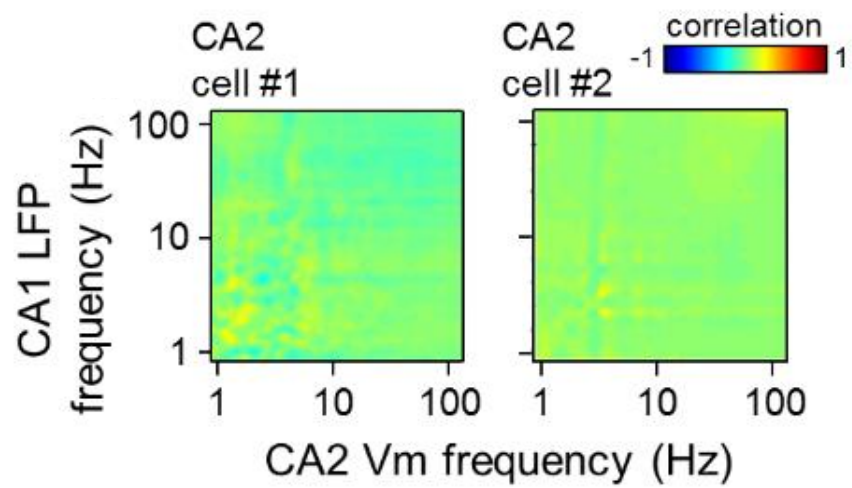


図 16 CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の強度の相関

CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の膜電位の相関係数をウェーブレット係数の絶対値を用いて求めた。

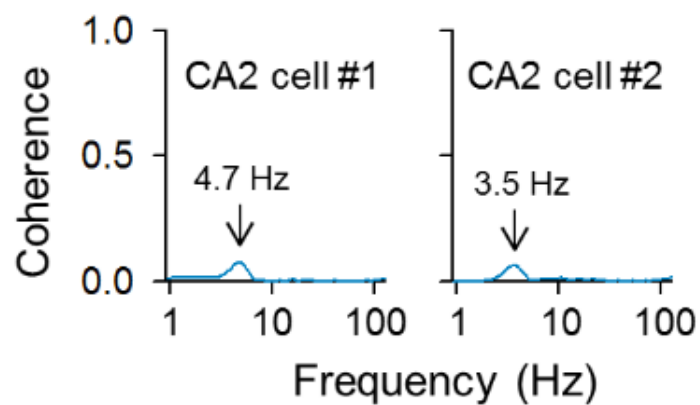


図 17 CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞のコヒーレンス（干渉性）
 CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の膜電位に対し、各周波数がどれだけ干渉しているかの度合い。

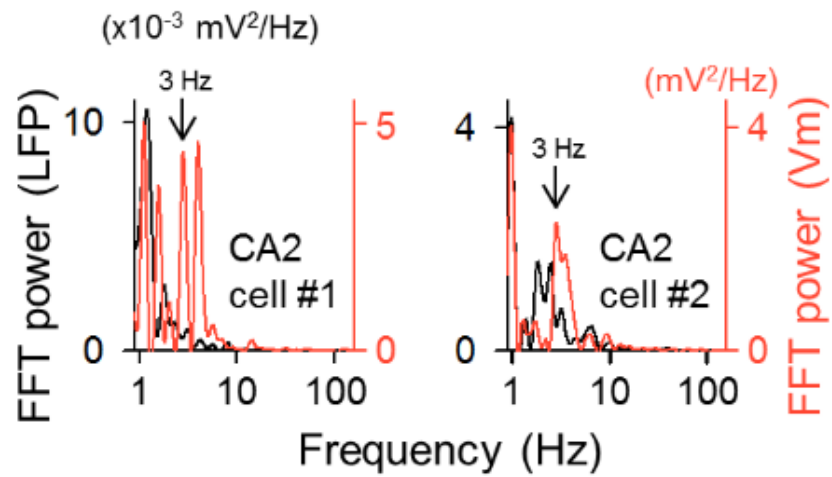


図 18 CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞のフーリエスペクトル

CA1 野の局所場電位と CA2 野錐体細胞の膜電位を高速フーリエ変換し、強度をスペクトルとして表示した。両神経細胞共に、ピークが 3 Hz 付近で重なっていない。

以上のことから、CA2 野における 3 Hz の膜電位振動は CA1 野の局所場電位と相関しないことが示された。

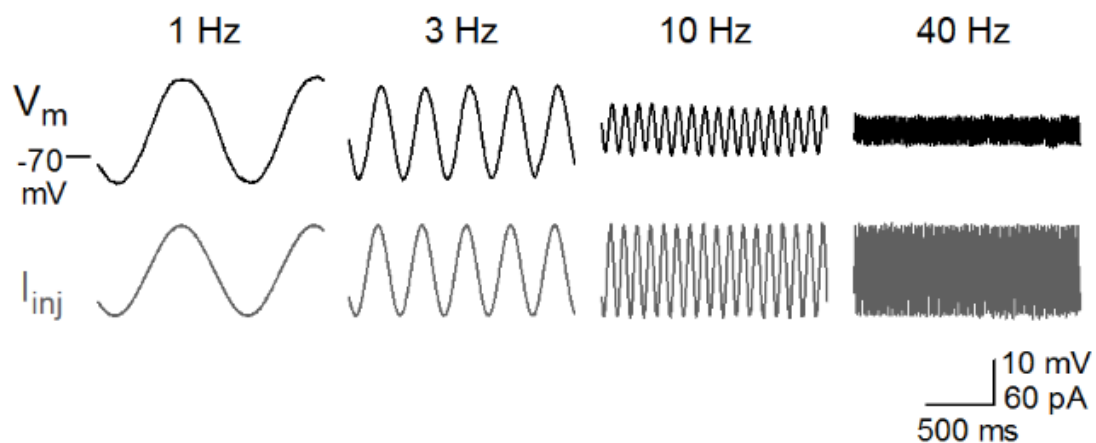


図 19 CA2 野錐体細胞に対する正弦波電流の注入 (*in vitro* パッチクランプ法)
1, 3, 10, 40 Hz の正弦波電流 (下) を注入した時の、CA2 野神経細胞の膜電位
変動の代表トレース (上)。

本実験は、1 μ M のテトロドトキシンを細胞外に灌流させ、急性海馬切片標本
を用いておこなった。

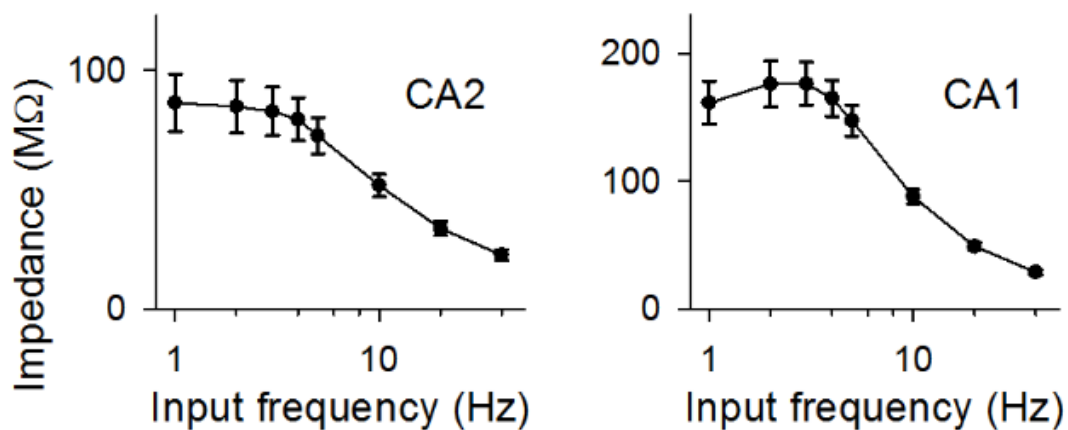


図 20 CA2 野錐体細胞は 3 Hz の交流電流に共鳴しない

CA2 野（左）および CA1 野（右）の錐体細胞のインピーダンスを正弦波電流の入力振動数 (input frequency) の関数として表示した。エラーバーは、CA2 野と CA1 野のそれぞれについて、10 細胞と 6 細胞の標準誤差を示す。

本実験は、1 μ M のテトロドトキシンを細胞外に灌流させ、急性海馬切片標本を用いておこなった。

5. 考察

本研究では、生体動物の CA2 野錐体細胞から膜電位の記録をおこない、13 個の CA2 野錐体細胞の膜電位ダイナミクスを観察した。約半数の CA2 錐体細胞の閾値下膜電位が約 3 Hz で振動していた。このような膜電位振動は、これまでの海馬神経細胞では報告されていなかったものである。

3 Hz の振動は、シータ帯域の最小周波数に近い (Buzsaki, 2002)。よって、今回発見した 3-Hz 振動は、麻酔により変調した海馬のシータ波の影響を受けていると考えることもできる (Soltesz and Deschenes, 1993; Ylinen et al., 1995)。実際、麻酔下でもシータ波は発生する。しかし、その可能性は低いだろう。シータ波は、CA1 野や CA3 野を含めた海馬全体のネットワークからなる振動だと考えられている (Lubenov and Siapas, 2009; Mizuseki et al., 2009)。そのため、もし CA2 野の 3-Hz 振動が海馬のシータ波を反映したものだとしたら、CA1 野のシータ波とも相関するはずである。しかし、今回、CA2 野の 3-Hz 振動イベントにおいて、CA1 野の局所場電位は特徴的な振動を示していなかった。

先行研究によると、ウレタン麻酔下のラットにおいて、CA1 野錐体細胞の膜電位はガンマ振動を示すことが知られており、これは CA1 野錐体細胞の細胞膜が共振する性質に起因するとされる (Penttonen et al., 1998)。それに対して、本研究では、3-Hz 振動イベント中においても 3-Hz 振動イベント外においても、CA2 野錐体細胞の膜電位において、ガンマ振動 (30-90 Hz) は見られなかった。さらに、本研究から、CA2 野錐体細胞はそもそも共振する性質を持たないことが示された。これらのことから、CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動は、CA1 野の (局所場電位の) ガンマ振動と互いに影響を及ぼし合っている可能性は低いと考えられる。

また、今回発見した 3-Hz 振動は、神経細胞の膜固有特性のみでは説明できない。CA2 野錐体細胞は、3-Hz 振動を呈していたが、膜固有特性としては 3 Hz の入力振動数で共鳴しなかった。CA1 野錐体細胞は、約 3 Hz の入力振動数に対して共振したものの、生体動物においては自発的な 3-Hz 振動がほとんど見られなかった。つまり、CA1 野錐体細胞は、3 Hz で共振する膜固有特性を持つものの、生体動物においては、上流からのランダムなシナプス入力

によって、規則的な膜電位振動をほぼ示さないと考えられる。一方、CA2 野錐体細胞では、3 Hz で共振する膜固有特性を持たなかったが、生体動物では 3-Hz 振動が観察された。これらのことから、CA2 野の 3-Hz 振動は、非共振性の膜固有特性を「凌駕する」ようなシナプス入力によって発生していると考えられる。本研究では、その源となるような領域やシナプス入力を同定できなかったものの、ヒントとなるのは、CA1 野の局所場電位との同時記録である。今回記録した CA1 野の局所場電位は、CA1 野の放線層から記録しているため、CA3 野からのシナプス入力や CA1 野内の局所回路を反映していると考えられる。このため、CA2 野の 3-Hz 振動は、CA3 野を起源とするものではないことが示唆される。

さらに、別の先行研究によれば、ウレタン麻酔下においては、視床下部の乳頭上核の細胞外電位が 4 Hz で振動していることが知られている (Kocsis and Kaminski, 2006; Kowalczyk et al., 2014)。そして、乳頭上核は、CA2 野には投射するが、CA1 野および CA3 野には投射しない (Vertes, 2015)。これらのことから、CA2 野錐体細胞の 3-Hz 振動は、CA2 野内の局所回路または、海馬外、特に間脳から CA2 野へのシナプス入力に起因すると考えられる。

今回は麻酔下の動物を用いていることもあり、この CA2 の 3-Hz 振動の帰納的意義を答えるのは難しい。しかし、近年、3 Hz (または、4 Hz) の周波数の重要性を提唱する報告がいくつか存在する。これらの報告をもとに、今後の研究の方向性を考えてみたい。

第一に、細胞外電位ではあるが、4 Hz の振動が他の脳領域 (内側前頭前野皮質、腹側被蓋野) でも観察されている (Fujisawa and Buzsaki, 2011)。この 4 Hz の振動は、海馬のシータ波と時間的に固定されており、作業記憶課題の遂行中に増強される。同様の 4 Hz の同期的神経活動は前頭前野皮質と扁桃体でも観察されており、これらは恐怖行動を調節している (Karalis et al., 2016)。本研究では、CA2 野の 3-Hz 振動が他の脳領域の神経活動と協調しているかを検討することはできなかったが、CA2 野の 3-Hz 振動と、他の脳領域における細胞外電位との相関を解析することができれば、CA2 野の 3-Hz 振動の生理学的意義や、3-Hz 振動を起こす責任脳領域に迫ることができるかもしれない。

第二に、本研究では、CA2 野の 3-Hz 振動が記録時間中ずっと発生しているのではなく、間欠的に発生していることを示した。3-Hz 振動が、特定の神経回路の活動や動物の状態と関連しているかを検討することは今後の課題であるが、断続的な 3-Hz 振動が脳状態の切り替わりや、行動の切り替わりと関連していれば、3-Hz 振動の意義にも迫れるだろう。

第三に、必ずしも全ての CA2 野神経細胞が 3-Hz ニューロンではないということを本研究では示した。3-Hz ニューロンと非 3-Hz ニューロンとは電気生理学的性質がほぼ共通していたが、膜電位振動という観点からは二つに分けることができた。これらは、不均質な細胞集団として CA2 野を構成しており、3-Hz ニューロンと非 3-Hz ニューロンのそれぞれが異なる役割を果たしている可能性がある。最近の研究では、細胞外記録法を用いて、CA2 野には二つの異なる細胞集団が存在しており、それぞれが無動時の位置の表象に関して別個の機能を持つことが示唆されている (Kay et al., 2016)。

自由行動下の動物の CA2 野錐体細胞から膜電位の記録をおこなうことができれば、行動と CA2 野錐体細胞の膜電位の挙動との関連を解明することができる。ただし、自由行動下の動物からの *in vivo* パッチクランプ記録は世界的に見ても、成功例は数少ない。

CA2 野は、社会性行動や攻撃行動などにも関与し、海馬の亜領域の中で特徴的である。一方、解剖学的には、CA2 野は視床下部からの投射を強く受け、CA2 野錐体細胞の細胞膜上には、オキシトシンやバソプレシンの受容体が豊富に存在する。このような、解剖学的、組織学的知見と行動学的知見の間を橋渡しする生理学的知見のひとつとして、本研究が今後の海馬の研究の土台になることを願ってやまない。

なお、本研究の内容は、次の雑誌にて公表済である。

Matsumoto, N., Okamoto, K., Takagi, Y., Ikegaya, Y. 2016. 3-Hz subthreshold oscillations of CA2 neurons *in vivo*. *Hippocampus* 26:1570-1578.

6. 参考文献

Abe R, Sakaguchi T, Matsumoto N, Matsuki N, Ikegaya Y. 2014. Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport* 25:1013-1017.

Amaral D, Lavenex P. 2007. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P MR, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editor. *The hippocampus book*. Oxford; New York: Oxford University Press. pp 37-114.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. 1971. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13:222-238.

Buzsaki G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.

Caruana DA, Alexander GM, Dudek SM. 2012. New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: hippocampal area CA2. *Learn Mem* 19:391-400.

Danielson NB, Zaremba JD, Kaifosh P, Bowler J, Ladow M, Losonczy A. 2016. Sublayer-specific coding dynamics during spatial navigation and learning in hippocampal area CA1. *Neuron* 91:652-665.

Fujisawa S, Buzsaki G. 2011. A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron* 72:153-165.

Funayama K, Minamisawa G, Matsumoto N, Ban H, Chan AW, Matsuki N, Murphy TH, Ikegaya Y. 2015. Neocortical rebound depolarization enhances visual perception. *PLoS Biol* 13:e1002231.

Harvey CD, Collman F, Dombeck DA, Tank DW. 2009. Intracellular dynamics of

hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature* 461:941-946.

Hitti FL, Siegelbaum SA. 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508:88-92.

Ishikawa D, Matsumoto N, Sakaguchi T, Matsuki N, Ikegaya Y. 2014. Operant conditioning of synaptic and spiking activity patterns in single hippocampal neurons. *J Neurosci* 34:5044-5053.

Jones MW, McHugh TJ. 2011. Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends Neurosci* 34:526-535.

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J and others. 2016. 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci* 19:605-612.

Kay K, Sosa M, Chung JE, Karlsson MP, Larkin MC, Frank LM. 2016. A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. *Nature* 531:185-190.

Kocsis B, Kaminski M. 2006. Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus* 16:531-540.

Kohara K, Pignatelli M, Rivest AJ, Jung HY, Kitamura T, Suh J, Frank D, Kajikawa K, Mise N, Obata Y, Wickersham IR, Tonegawa S. 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci* 17:269-279.

Kowalczyk T, Bocian R, Caban B, Konopacki J. 2014. Atropine-sensitive theta rhythm in the posterior hypothalamic area: in vivo and in vitro studies. *Hippocampus*

24:7-20.

Kuga N, Sasaki T, Takahara Y, Matsuki N, Ikegaya Y. 2011. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci* 31:2607-2614.

Lubenov EV, Siapas AG. 2009. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 459:534-539.

Makino K, Funayama K, Ikegaya Y. 2016. Spatial clusters of constitutively active neurons in mouse visual cortex. *Anat Sci Int* 91:188-195.

Mankin EA, Diehl GW, Sparks FT, Leutgeb S, Leutgeb JK. 2015. Hippocampal CA2 activity patterns change over time to a larger extent than between spatial contexts. *Neuron* 85:190-201.

Mizunuma M, Norimoto H, Tao K, Egawa T, Hanaoka K, Sakaguchi T, Hioki H, Kaneko T, Yamaguchi S, Nagano T, Matsuki N, Ikegaya Y. 2014. Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons. *Nat Neurosci* 17:503-505.

Mizuseki K, Diba K, Pastalkova E, Buzsáki G. 2011. Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat Neurosci* 14: 1174-1181.

Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsaki G. 2009. Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64:267-280.

Pagani JH, Zhao M, Cui Z, Avram SK, Caruana DA, Dudek SM, Young WS. 2015. Role of the vasopressin 1b receptor in rodent aggressive behavior and synaptic plasticity in hippocampal area CA2. *Mol Psychiatry* 20:490-499.

Penttonen M, Kamondi A, Acsady L, Buzsaki G. 1998. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur J Neurosci* 10:718-728.

Piskorowski RA, Nasrallah K, Diamantopoulou A, Mukai J, Hassan SI, Siegelbaum SA, Gogos JA, Chevaleyre V. 2016. Age-dependent specific changes in area CA2 of the hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome. *Neuron* 89:163-176.

Sakaguchi T, Ishikawa D, Nomura H, Matsuki N, Ikegaya Y. 2012. Normal learning ability of mice with a surgically exposed hippocampus. *Neuroreport* 23:457-461.

Smith AS, Williams Avram SK, Cymerblit-Sabba A, Song J, Young WS. 2016. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol Psychiatry* 21:1137-1144.

Soltesz I, Deschenes M. 1993. Low- and high-frequency membrane potential oscillations during theta activity in CA1 and CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus under ketamine-xylazine anesthesia. *J Neurophysiol* 70:97-116.

Valero M, Cid E, Averkin RG, Aguilar J, Sanchez-Aguilera A, Viney TJ, Gomez-Dominguez D, Bellistri E, de la Prida LM. 2015. Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nat Neurosci* 18:1281-1290.

Vertes RP. 2015. Major diencephalic inputs to the hippocampus: supramammillary nucleus and nucleus reuniens. Circuitry and function. *Prog Brain Res* 219:121-144.

Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsaki G. 1995. Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells,

and basket cells. *Hippocampus* 5:78-90.

Zemankovics R, Kali S, Paulsen O, Freund TF, Hajos N. 2010. Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics. *J Physiol* 588:2109-2132.

7. 謝辞

本研究をおこなうにあたり、直接ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心より御礼を申し上げます。高校一年生の頃に先生の本を読んで以来、先生のもとで学びたいと考えて、ここまで何とか辿り着きました。先生のもとで研究をしていく中で、自分の不出来な面を幾度となく痛感する場面があり、そのたびに自己嫌悪に陥ったり、焦燥感に駆られたりしていました。その一方で、先生の仕事の早さ、アイデアの多さは、自分も将来こうなりたいと思える理想像です。博士課程の途中で、それまで続けていたテーマをやめ、新たなテーマに移って、そしてここまで走り抜けることができたのは、先生のおかげです。海馬 CA2 野からの *in vivo* パッチクランプ記録という魅力的な研究に引き合わせてくださったこと、電気生理学、行動実験、イメージングをはじめとした様々な実験手技を学ぶ機会を与えてくださったこと、実験のアイデアから実行、データの解析に至るまで常に有益なご助言を頂いたこと、胸が躍るディスカッションを重ねてくださったこと、数々の叱咤激励、そして常に明るいお言葉をかけてくださったことに感謝してもしきれません。本当にありがとうございました。

本研究をおこなうにあたり、終始ご指導を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 松木則夫 名誉教授に心より御礼を申し上げます。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 小山隆太 准教授に心より御礼を申し上げます。特に最後の年は、相次ぐ怪我や薬局実務実習などでご迷惑をかけてばかりでした。一方で、進路の相談にも親身に乘ってくださり、勇気を得ることができました。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有

益なご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室
野村洋 前助教に心より御礼を申し上げます。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究や今後の研究に対し常に有益なご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 佐々木拓哉 助教に心より御礼を申し上げます。海馬の *in vivo* 電気生理学の先達として、私の研究に常に的確なご助言を賜りました。そして、実験や研究に関するご助言のみならず、各種申請書や各種プレゼンテーションにおいては、鋭いご指摘を賜りました。そして、校正されていく申請書やプレゼンテーション資料は、明らかにその前のバージョンからは見違えるほどに改善していました。今後、日本学術振興会特別研究員として、少なくとも三年間は身を立てることができたのは、ひとえに先生のおかげです。本当にありがとうございました。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 中嶋藍 助教に心より御礼を申し上げます。研究に対する先生のストイックな姿勢には、非常に刺激を受けていました。

研究室でのセミナーをはじめとする議論の場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 竹内春樹 さきがけ研究員に心より御礼を申し上げます。グループの垣根を越えて、常に明るく声をかけてくださり、いつも元気をいただいていた。また、研究者かつスポーツマンという、私の中ではほとんど出会ったことのないカテゴリーの先生でした。私も研究と運動を両立できる研究者になりたいと考えています。

研究生活を送るにあたり、自身が留学しても終始サポートしてくださった、東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 卒業生 南澤玄樹 博士に心より深く御礼を申し上げます。研究者としての姿や、日々の弛まぬ実

験や勉強、筋力トレーニング、サバット、後輩指導、そして明るさは私の大きな目標です。さらに、精神的にも常に支えとなってくれました。「継続は力なり」を体現している南澤博士に追い付けるよう精進いたします。

研究生生活を送るにあたり、留学後もいつも気にかけてくださった、東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 卒業生 橋川浩一 博士に心より深く御礼を申し上げます。常に勉強し、常に考える姿勢、泊まり込みで実験を行うほどの研究に対する情熱と覚悟、後輩指導、サーフィンへの熱い思い、また、常に笑いをとる技術は、私にとっての理想の先輩像です。先輩の留学後はお会いする機会が減ったものの、会うたびに進化を続けている先輩に追い付けるよう精進いたします。

データを提供して頂き、また共著者として投稿論文を執筆した東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 岡本和樹、高木夕貴 各氏に心よりお礼を申し上げます。二人のご協力なしに、本研究をまとめ上げることはできませんでした。

池谷グループとして、本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言をいただきました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 卒業生 高橋直矢、シャーラー・ワルダニ、宇佐美篤、水沼未雅、南澤玄樹、石川大介、宇治田早紀子、岡田沙織、小林千晃、乗本裕明、舟山健太、松本光樹、宮嶋晃輔、浅田晶子 各氏に心より御礼を申し上げます。

池谷グループとして、本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くの助言をいただきました東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 坂口哲也、阿部麗実、石川智愛、宮脇健行、岩寄諭嗣、大内彩子、岡田真実、岡本和樹、牧野健一、高木夕貴、渡邊裕亮、高夢璇、野口朝子、八幡洋輔 各氏に心より御礼を申し上げます。皆様の知識と技術と気合いがあれば、今後の池谷グループも益々発展すると思います。

日々の研究生生活を送る中で、温かいご支援をいただきました、東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 卒業生の皆様に心より御礼を申し上げます。

日々の研究生生活を送る中で、温かいご支援をいただきました、東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 五十嵐ひかる、柴田和輝、笠原由佳、小島寛人、鹿野悠、周至文、井形秀吉、伊原尚樹、孫雪竹、中山亮太、西村侑也、星雄高、羅聡、青木勇樹、安藤めぐみ、岡田桜、小川敦也、平木俊光、八木佐一郎、小野寺純也、香取和生、野仲航司 各氏に心より御礼を申し上げます。

数々の実験において犠牲となった実験動物に感謝するとともに、御冥福をお祈りいたします。

プライベートの場で、笑いと楽しさを提供して下さった、河合塾 津田沼校の皆様に、心より御礼を申し上げます。皆様と楽しい時間を過ごし、リフレッシュすることで、いつでも前向きに研究することができました。

プライベートの場で、常に元気をくださった、根岸祐輔、池尻和明、久保卓也、田中智絵、中川高之、松高祥子、横地美優 各氏に心より御礼を申し上げます。皆様との楽しい時間によって、気持ちをいつも明るく保つことができました。

落ち込んだ時も悩んだ時も楽しい時も、常に応援してくださった、横井佐織 博士に心より御礼を申し上げます。常に自分の味方でいてくれてありがとう。これから険しい道が続くかもしれませんが、お互い助け合って高め合っていくことができれば幸いです。

最後に、私を支え続けてくださった、父 松本明久、母 松本礼子、姉 洸脇貴子、姪 洸脇彩華、甥 洸脇青龍 に謹んで感謝の意を表します。常に

私の健康を気にかけてくださり、また、応援のメッセージを送ってくださいました。辛い時も悲しい時も悩んだ時も嬉しい時も楽しい時も、常に味方でいてくれて本当に心強かった。十年という長い学生生活を送る中で、何も返せていないと自己嫌悪に陥ることもありました。その中でも、思う存分やることをやった方が良いと背中を常に押してくれて、そのおかげで、ここまでたどり着くことができました。本当にありがとうございました。

以上の全ての方々に、謹んで感謝の意を表し、本博士論文の結びといたします。