

## 論文の内容の要旨

# マウス海馬 CA2 野神経細胞の膜電位振動

松 本 信 圭

### 【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。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適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。

## 【結果・考察】

### 1. CA2 野には膜電位が 3 Hz で振動する錐体細胞が存在する

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 (図 1A)。本手法により、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



図1: 実験手法 (*in vivo* パッチクランプ法)  
(A) 生きた動物のCA2錐体細胞から膜電位 (灰色: 閾値下膜電位) を記録した。(B) 記録後には、記録ニューロンの形態を再構築した。また、CA2野特異的なマーカータンパク質の免疫組織化学染色により、記録領域を同定した。

ことができる (図 1B)。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。

記録の結果、CA2 錐体細胞の 60% は、膜電位が約 3 Hz で振動していることを発見した (振動性ニューロン: 図 2A)。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

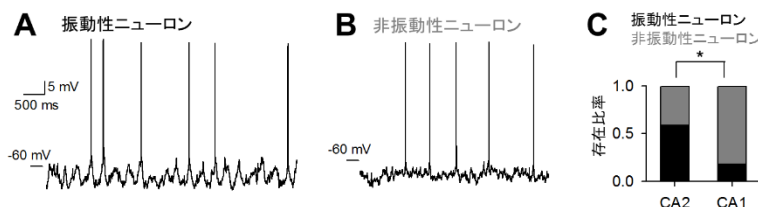


図2: CA2野に存在する振動性ニューロン  
(A) CA2野のニューロンの一部は、3 Hz で振動していた (振動性ニューロン)。(B) CA2野には、膜電位が 3 Hz で振動しないニューロンも存在した。(C) 振動性ニューロンの存在比率は、CA1野よりもCA2野で有意に高かった。\* $P = 0.026$ , Fisher's exact test.

(非振動性ニューロン: 図 2B)。また、対照領域として、CA2 野の隣の 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 (図 2C)。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。

以下では、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た。

### 2. 振動性ニューロンの空間分布に大きな特徴はない

CA2 野の振動性ニューロンが領域内でどのように分布しているのかを検討するため、

CA2 野を疑似的な長方形に見立て、振動性ニューロンの位置を解析した。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(図 3A)。求めた相対位置をもとに、振動性ニューロンの幾何学的エネルギーを算出した(実データ)。幾何学的エネルギーは、対象とする集団が一か所に集中しているほど高い値を示す指標である。記録された全ての CA2 錐体細胞から、幾何学的エネルギーの疑似データを求め、ヒストグラムにし、実データと比較した(図 3B)。実データと疑似データとの間に有意な差は認められず、振動性ニューロンは CA2 野内でランダムに存在していることが示唆された。また、CA3 野から CA1 野へ向かう軸について、振動性ニューロンの相対座標の歪度を計算し(実データ)、疑似データのヒストグラムと比較した(図 3C)。脳幹から脳表へ向かう軸についても同様の解析をおこなった(図 3D)。いずれの歪度についても、実データと疑似データとの間に有意な差は認められなかった。

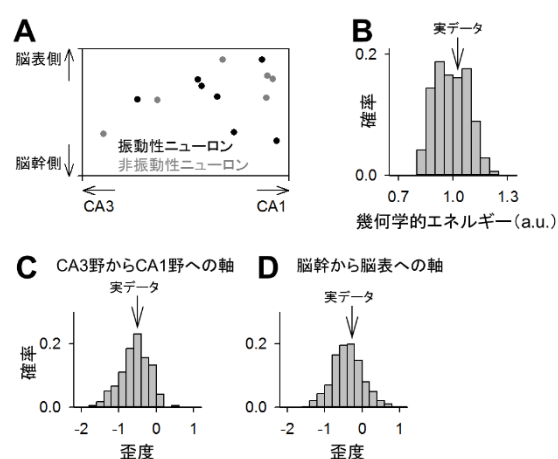


図3: CA2野における振動性ニューロンの分布はランダムである  
(A) CA2野を疑似的な長方形とみなし、振動性ニューロン(黒)と非振動性ニューロン(灰)の細胞体の相対位置をプロットした。(B) 記録された全てのCA2錐体細胞のうち、振動性ニューロンの数だけランダムに選び、全ての場合同様に幾何学的エネルギーを求めヒストグラムとして表した。実データが含まれるピンは黒矢印で示した。(C) CA3野からCA1野へ向かう軸について、振動性ニューロンの相対位置の歪度を求めた(実データ)。(B)と同様に、疑似データを求め、ヒストグラムとして表した。(D) 脳幹から脳表へ向かう軸について、(C)と同様に、振動性ニューロンの相対位置の歪度を求めた。

### 3. 振動性ニューロンの膜電位振動は、海馬全体の神経活動とは独立して発生している

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。その検討のため、CA2 錐体細胞の膜電位と同時に、海馬の脳波を記録し比較をおこなった(図 4A)。脳波は、複数のニューロンの神経活動の総和である。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(図 4B)。

### 4. CA2 錐体細胞は、3 Hz で膜電位振動を起こしやすい固有特性を持たない

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(図 5B)。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応答しやすいか検討した。

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、周期的に振動する電流(振幅 60 pA)を注入した(図 5A)。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することがで

きる。特定の周波数（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（図 5B）。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。

## 【総括】

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ている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。本研究では、麻酔下での自発活動を観察するにとどまり、膜電位振動の有無による機能の差異や 3 Hz の膜電位振動を生み出すメカニズムまで追究することはできなかったが、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。

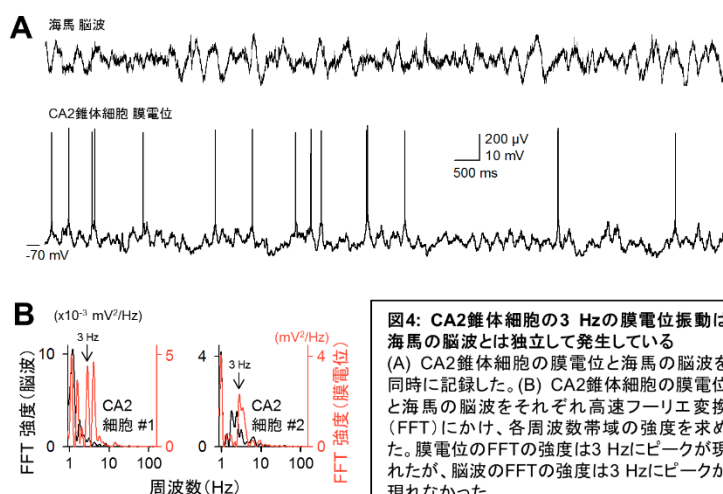


図4: CA2錐体細胞の3 Hzの膜電位振動は海馬の脳波とは独立して発生している (A) CA2錐体細胞の膜電位と海馬の脳波を同時に記録した。(B) CA2錐体細胞の膜電位と海馬の脳波をそれぞれ高速フーリエ変換 (FFT) にか、各周波数帯域の強度を求めた。膜電位のFFTの強度は3 Hzにピークが現れたが、脳波のFFTの強度は3 Hzにピークが現れなかった。

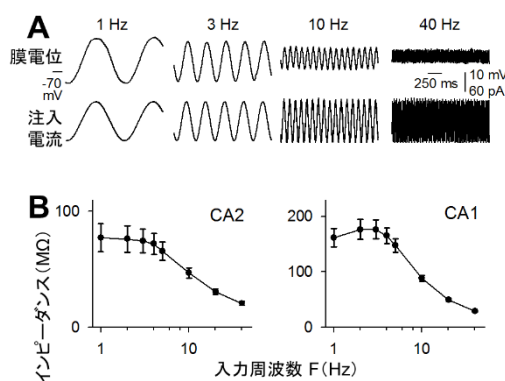


図5: CA2錐体細胞は3 Hzで膜電位振動を起こしやすい膜固有特性を持たない (A) CA2錐体細胞にF Hzで周期的に振動する正弦波電流を注入し、膜電位応答を記録した。(B) CA2およびCA1錐体細胞に、正弦波電流を注入した際の、細胞膜のインピーダンス。インピーダンスが高いほど、その細胞膜は、F Hzで振動する電流に最もよく共鳴することを示す。