

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500344

研究課題名（和文）in vivo ホールセル記録法による前庭神経核ニューロンの機能特性の解明

研究課題名（英文）*In vivo* whole-cell patch-clamp analysis of spike discharge patterns of rat medial vestibular nucleus neurons

研究代表者

齋藤 康彦 (SAITO YASUHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70290913

研究成果の概要：視線・姿勢制御を司る前庭神経核ニューロンの電気生理学的膜特性、自発発火特性をラット in vivo 標本でのホールセル記録により調べた。その結果、これまで in vitro スライス標本において得られていた電気生理学的膜特性に関する知見が in vivo においても確認され、さらに自発発火が規則的に発生するの否かは、膜特性の一つであるスパイク後過分極のタイプの違いに依存していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：前庭神経核、ニューロン、膜特性、自発発火、眼球運動

1. 研究開始当初の背景

前庭神経核ニューロンの活動様式については、ネコやサル of in vivo 標本において、単一細胞の活動電位発生に伴う電位変化を記録する細胞外ユニット記録法による研究が古くからなされ、頭部回転、頭部や視線の固定、眼球運動などに関連した活動様式を示すニューロン群が明らかにされた。一方で、近年、前庭神経核を含む脳幹の in vitro スライス標本を用いた研究方法が確立され、前庭神経核には電気生理学的膜特性の異なるニ

ューロン群が存在することが明らかになり、膜特性をもとにした前庭神経核ニューロンの分類が試みられた。フランスのグループを中心に行われた研究では、前庭神経核ニューロンは、スパイク後の一過性の過分極（スパイク後過分極、AHP）の違いをもとに主に Type A、B の2種類のニューロン群に分類され、どちらにも含まれないタイプ（Type C）のニューロンはわずかであることが示唆された（Serafin et al., Exp. Brain Res. 84: 417-425, 1991）。研究代表者らは、分類されたニューロン群が興奮性ニューロンなのか

抑制性ニューロンなのかを明らかにするため、ホールセルパッチクランプ法と RT-PCR 法を組み合わせ、膜特性と神経伝達物質関連マーカーとの関連を調べた。このとき、AHP のみならず、発火パターン、過分極応答の 3 種類の膜特性をもとに前庭神経核ニューロンを分類したところ、Type C に含まれるニューロンが数多く認められ、このニューロン群は数種類のサブタイプに分かれることが明らかになった。さらに、研究代表者らの分類方法は、神経伝達物質関連マーカーの発現パターンとの対応関係がより明確であることが明らかになった (Takazawa et al., J. Neurophysiol 92: 3106-3120, 2004)。

このように、研究代表者らを含めいくつかの研究グループにおいて前庭神経核ニューロンの膜特性に関する研究がなされているが、*in vitro* で明らかになった膜特性が実際に *in vivo* において認められるのか、さらに、*in vitro* で分類されたニューロン群は、*in vivo* 標本で明らかになった活動様式の異なるニューロン群とどのような対応関係にあるのかについて明らかにされていない。フランスのグループは、脳切片ではなく、取り出した脳全体を人工脳脊髄液中で培養する方法 (*in vitro* whole brain preparation) を用いて前庭神経核ニューロンから細胞内記録を行い、個々のニューロンの膜特性や末梢前庭線維刺激に対するシナプス応答を調べたが (Babalian et al. Neuroscience 84:2514-2528, 1997)、やはり *in vitro* の状況下であることに変わりはなく、*in vivo* でのニューロン活動と膜特性の関係については依然未知のままであった。研究代表者はスライス標本にてホールセルパッチクランプ法によりニューロン活動を記録しているが、この方法は機械的な操作に対しても安定した記録が可能であるという特長がある。従って、*in vivo* 標本においてホールセル記録法により前庭神経核ニューロンから記録を行うことにより、ニューロンの膜特性のみならず頭部回転に対する反応特性などの前庭機能との関係について明らかになると考えられた。しかし、これまで、前庭神経核はおろか、脳幹のニューロンにおいて *in vivo* 標本でホールセルパッチクランプ記録を行った

研究は皆無であった。そこで研究代表者は、*in vivo* パッチクランプ法を用いて前庭神経核ニューロンから記録するプロジェクトに着手し、2006 年までにラット *in vivo* 標本で前庭神経核ニューロンからホールセル記録することに成功した。

2. 研究の目的

前庭神経核ニューロンからの *in vivo* ホールセル記録の成功により、実際に *in vivo* で前庭神経核ニューロンの活動を調べる術を得た。そこで、本研究では、1) *in vitro* で明らかになった膜特性が実際に *in vivo* において認められるのか、2) *in vitro* で分類されたニューロン群は、*in vivo* 標本で明らかになった活動様式の異なるニューロン群とどのような対応関係にあるのか、という 2 つの問いに対する解答を得ることを目的とする。そのために、本研究では、*in vivo* 標本における前庭神経核ニューロンの電気生理学的膜特性の解析を行い、その結果を *in vitro* での結果と比較することにより、前庭神経核ニューロンを上記の 3 種類の膜特性をもとに分類可能であるのか検討する。さらに、前庭神経核ニューロンの自発発火特性に着目し、*in vivo* 標本における前庭神経核ニューロンの自発発火特性の解析を行う。自発発火特性については *in vitro* 標本においても研究を行い、薬理的解析によって自発発火特性のメカニズムについても明らかにする。

3. 研究の方法

in vivo 標本の作製のため、体重 200-300 g のラットをイソフルレンにより吸引麻酔し、十分に麻酔が効いた状態で、動脈、静脈血管を確保し、気管切開しカニューレを取り付けた。動物を脳定位固定装置にセットした後、開頭して、デンタルドリルで小脳を覆っている頭蓋を取り除いた。硬膜を切除した後、小脳虫部を吸引除去し、前庭神経核を露出させた。筋弛緩剤を静脈から投与することで不動化し、人工呼吸器に接続し、低容量、高頻度の換気を行なった。ホールセル記録はウレタン麻酔下で行うため、血圧、心拍等をモニターしながらウレタンを腹腔内投与し、その後、

イソフルレンの吸引麻酔を停止した。前庭神経核ニューロンからのホールセルパッチクランプ記録では、パッチ電極を実体顕微鏡下で前庭神経核の近くまで誘導し、パッチ電極に陽圧をかけながらマニピュレータで前庭神経核へ電極を進入させた。パッチ電極の抵抗をオシロスコープでモニターしながら、前庭神経核ニューロンからギガオームシールを形成した。パッチ内の膜を破ってホールセルモードにし、膜電流固定下において、脱分極性通電に対する活動電位の発生パターン、過分極通電に対する応答を記録することによりそのニューロンの膜特性を明らかにした。また、自発発火特性を調べる際には、ニューロンの電流を注入しない状態で自発的に生じる活動電位発生の様子を記録し、スパイク間隔のばらつきから自発発火の規則性を検討した。

4. 研究成果

(1) in vitro標本における前庭神経核ニューロンの電気生理学的膜特性の解析

前庭神経核ニューロンの電気生理学的膜特性について、*in vitro* スライス標本で明らかになった知見が実際に *in vivo* において認められるのかについて調べた。膜特性は、電流通電に対するスパイク後過分極 (AHP)、発火パターン、過分極通電による応答特性の3種類の電位応答をもとに決定した。*in vitro* スライス標本での研究において、AHP は、時間経過の速い1つのピークのみをもつものと時間的に遅い成分をあわせもつものが観察され、遅い成分をもつAHPに関しては、時間的に早いAHPと遅いAHPの間に一過性の脱分極 (afterdepolarization, ADP) が顕著なものとして観察された。発火パターンについては、スパイク間隔がほぼ一定の連続的な発火を示すタイプ (continuous spiking)、スパイクの発生が時間的に遅れるタイプ (late spiking)、スパイク発生時にバースト発火 (数発の高頻度な発火) を示すタイプ (burst spiking)、通電の途中で連続的な発火を示さなくなるタイプ (adaptation spiking) の4種類が観察された。過分極応答については、過分極性の通電量に比例して

電圧応答が大きくなるものと、通電量を大きくするにつれ膜電位変化が小さくなるいわゆる内向き整流特性を示すものが観察された。内向き整流特性を示すタイプには、その特性が時間に依存するもの (時間依存的内向き整流特性) と依存しないもの (時間非依存的内向き整流特性) とに分類された。*in vivo* ホールセル記録によって上記の3種類の電位応答について調べたところ、3種類のAHP、3種類の発火パターン、3種類の過分極応答が観察された。発火パターンのうち、adaptation spiking が *in vivo* において観察されなかったが、このパターンは *in vitro* においてもまれにしか観察されなかったことから、前庭神経核においてマイナーな細胞集団であると考えられた。3種類の膜特性をもとに、前庭神経核ニューロンを分類すると、continuous spiking を示すニューロンの多くが、AHP は時間的に遅い成分とADPを示すものが多数を占めていた。一方、late spiking を示すニューロンでは、時間経過の速いAHPを示すニューロンの割合が多く、ADPを示すものを示すものは少数であった。これらの特徴は *in vitro* においても観察された知見である。さらに、膜特性をもとに分類されたニューロン全体の分布を比較すると、*in vivo* での結果は *in vitro* での結果とほぼ同じであった。以上の結果から、前庭神経核ニューロンを上記の3種類の膜特性をもとに分類可能であることが *in vivo* 標本においても確認された。この成果は、2007年のNeuroscience Research誌で発表した。

(2) 前庭神経核ニューロンの自発発火特性の解析

前庭神経核ニューロンの自発発火特性については、これまで *in vivo* の研究により、自発発火が規則的に生じるタイプ (regular ニューロン) と不規則なタイプ (irregular ニューロン) が見つかっており、それぞれ異なる周波数の頭部回転に応じることが示されている (Shimazu and Precht J. Neurophysiol 28: 911-1013, 1965)。このことは、前庭神経核では、様々な頭部回転に対して、反応特性の異なるニューロン群によって別々に情報処理がなされていることを示唆する。そこ

で、膜特性によって分類された前庭神経核ニューロンが regular type なのか irregular type なのかについて調べた。自発発火の規則性は、スパイク間隔の標準偏差を平均値で割った値（分散係数）によって評価した。従って、分散係数が低い発火ほど規則的に発火していることを示す。In vivo 標本において前庭神経核ニューロンからホールセル記録を行い、自発発火を記録して解析したところ、自発発火の規則性は3種類の膜特性のうちAHPのタイプによって異なっており、時間経過の遅いAHPを示すニューロン群において規則的な自発発火を示し、一方、時間経過の速いAHP、またはADPを示すニューロン群は不規則な自発発火をすることが明らかになった。一方で、in vitro スライス標本においても自発発火を解析したところ、in vivo において観察されたようなAHPのタイプによって自発発火の規則性が異なる知見が得られなかった。この原因として、in vitro では自発発火の発生頻度が少なく、個々のニューロンの自発発火の発生のばらつきが大きかったことが挙げられた。そこで、ニューロンに定電流を注入することにより、自発発火を10 spikes/s以上に増加させてから規則性を調べたところ、in vivo で得られた結果と同じ結果が得られた。規則的な自発発火は時間経過の遅いAHPを示すニューロン群において見られることから、遅いAHPを作り出すイオンチャンネルの一つであるSK型カルシウム依存性カリウムチャンネルの発現が規則的な自発発火を引き起こす原因となっている可能性が考えられた。そこで、このチャンネルをブロックすることにより規則的な自発発火が不規則なものになるのかを検討するため、SK型カルシウム依存性カリウムチャンネルのブロックであるアパミン投与に対する自発発火の変化を調べた。その結果、予想したとおり、アパミン投与によって分散係数の値が増加し、規則的な自発発火が不規則なものになった。

前庭神経核における regular ニューロンと irregular ニューロンは、自発発火の規則性が異なるだけでなく、刺激に対する応答特性も異なっており、irregular ニューロンは刺激に対する発火応答（利得）が regular ニューロンに比べ大きいことが知られている。

そこで、AHPのタイプが異なるニューロン間でランプ電流の注入に対する発火応答の違いについて検討した。その結果、時間経過の速いAHPを示すニューロンの利得が他の2種類のAHPを示すニューロンの利得に比べ大きかった。以上の結果により、時間経過の速いAHPを示すニューロンはirregularニューロン、時間経過の遅いAHPを示すニューロンはregularニューロンに相当し、ADPを示すニューロンはregularニューロンとirregularニューロンの中間型であることが明らかになった。

以上の研究により、膜特性と自発発火の規則性との関係が明らかになり、SK型カルシウム依存性カリウムチャンネル前庭神経核ニューロンの規則的な自発発火の生成に関与することが明らかになった。この成果は、2008年のEuropean Journal of Neuroscience誌で発表した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① Saito Y., Takazawa T., and Ozawa S., Relationship between afterhyperpolarization profiles and the regularity of spontaneous firings in rat medial vestibular nucleus neurons. Eur. J. Neurosci. 28, 288-298, 2008, 査読有
- ② Saito Y. and Ozawa S., Membrane properties of rat medial vestibular nucleus neurons *in vivo*. Neurosci. Res., 59, 215-223, 2007, 査読有

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 康彦 (SAITO YASUHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70290913

(2) 研究分担者 なし