

博士論文

嫌悪刺激および報酬に対する
背側-腹側海馬の活動

岡田 桜

目次

1. 序論	4
1-1. 背側・腹側海馬の構造および機能的な差異	4
1-2. 海馬神経細胞の場所依存的な活動	5
1-3. 海馬神経細胞の情動要素依存的な活動	5
1-4. 睡眠・安静時の海馬神経活動	6
1-5. 背側・腹側海馬神経活動の関係	6
1-6. 本研究の目的	7
2. 方法	8
2-1. 実験動物	8
2-2. 行動課題	8
2-3. 行動課題のトレーニング	9
2-4. 電極セットの作成	10
2-5. マイクロドライブ埋め込み手術	10
2-6. 電極の位置調整	11
2-7. 電気生理学的記録	12
2-8. 電極位置確認のための組織学的解析	12

2-9. スパイクソーティング	14
2-10. 走行軌跡の解析	14
2-11. 個々の細胞の空間依存的な発火活動についての解析	14
2-12. 個々の細胞の情動要素に対する反応性についての解析	15
2-13. 局所場電位の解析	15
2-14. リップル中の発火活動の解析	16
3. 結果	17
3-1. 報酬および嫌悪刺激を伴う行動課題の構築	17
3-2. 背側・腹側海馬からの同時記録手法	18
3-3. 情動に関わる要素に反応性を示す細胞が存在する	18
3-4. 空間に対して反応性を示す細胞が存在する	19
3-5. 背側・腹側海馬間のリップル同期度合いは低い	20
3-6. 各領域リップル発生時の発火活動変化	21
3-7. 腹側海馬細胞は背側海馬リップル時に活動が抑制される	22
3-8. 腹側海馬細胞は特に独立に生じる背側海馬リップル時に抑制される	22
3-9. 情動要素に反応性を持たない腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制さ	

れる.....	23
3-10. 場所細胞でない腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制される.....	24
4. 図	25
5. 考察	45
5-1. 空間依存的な発火活動を示す海馬神経細胞.....	45
5-2. 情動要素に対して反応性を示す海馬神経細胞の行動への影響.....	46
5-3. 情動要素に対して反応性を示す腹側海馬神経細胞集団.....	47
5-4. 情動要素に対して反応性を示す背側海馬神経細胞集団.....	48
5-3. 背側・腹側海馬リップル発生時の神経活動.....	49
6. 総括	52
7. 参考文献	54
謝辞.....	61

1. 序論

1-1. 背側・腹側海馬の構造および機能的な差異

脳領域の 1 つである海馬は、背腹軸に添って長く広がる領域であり、背側海馬と腹側海馬に分けることができ、これらは異なる性質を持つことが知られている(図 1A)。構造に着目すると、背側海馬の神経細胞は線条体や嗅内皮質へ投射を送っている(Fanselow and Dong, 2010)。これらの脳領域は、空間認識などに関わることが知られている。一方で、腹側海馬の神経細胞は扁桃体や側坐核、前頭前皮質といった脳領域に投射を持っており(Cenquizca and Swanson, 2007; Arszovszki et al 2014)、これらの脳領域は恐怖などの情動に関わることが知られている。

また、薬理学的手法を用いた破壊・抑制実験によって背側・腹側海馬の機能についても調べられている。背側海馬神経細胞の除去を行うと、空間記憶課題の成績が低下することが示されている(Moser et al., 1995; Pothuizen et al., 2004)。これらの知見から、背側海馬は一般に空間認識や学習に関わると考えられている。対して、背側海馬ではなく腹側海馬の除去では不安様行動が減少することが明らかにされている(Kjelstrup et al., 2002)。また近年、光遺伝学的手法を用いて、腹側海馬神経細胞のうち特定の脳領域に投射を持つものみの活動を操作した際の行動変化についても研究が行われてきている。例えば、内側前頭前皮質や扁桃体に投射を送っている腹側海馬神経細胞を特異的に抑制すると不安様行動が減少する(Flix-Ortiz et al., 2013; Padilla-Coreano et al., 2016) ことが示されている。また一方で腹側海馬から外側中隔への経路を活性化するとその場所への滞在時間が延長すること(Parfitt, et al., 2017)も示されており、腹側海馬の活動はポジティブ(正)、ネガティブ(負)両方の情動に関わ

ると考えられている。

1-2. 海馬神経細胞の場所依存的な活動

近年、実際に動物が行動している際の神経活動を、単一細胞の発火活動に分離できるレベルで記録をした報告がされてきている。特に背側海馬神経細胞が示す、動物のいる場所に依存的な発火活動 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971) についてはこれまでに多数の報告が存在している。このような場所特異的な活動を示す細胞は特に「場所細胞」と呼ばれる。この場所細胞が存在することからも、背側海馬は環境の情報を脳内で表象し、環境の認識や学習を行っていると考えられている (Tolman, 1948; O'keefe and Nadel, 1979)。

一方で背側海馬と比較して腹側海馬は脳深部に存在し、また狭い領域であるため電極を刺入することが非常に難しい。しかし、腹側海馬神経細胞の活動の電気生理記録を行った報告もごくわずかであるが存在しており、腹側海馬にも場所細胞が存在する (Jung et al., 1994) が、その割合は背側海馬よりも割合は低いことが明らかにされている。

1-3. 海馬神経細胞の情動要素依存的な活動

さらに海馬の神経細胞は場所以外の要素に対しても発火活動の変化を示すことが調べられている。中でも情動に関わる要素に対する活動変化についての研究では、動物の不安や報酬に応じて活動が変化する神経細胞が腹側海馬に存在すること (Ciocchi et al., 2015; Jimenez et al., 2018) が報告されている。一方で、背側海馬にお

いても報酬に対して活動を変化させる神経細胞が存在することも近年明らかにされている(Gauthier et al., 2018)。すなわち、背側・腹側海馬には共に情動要素に反応する神経細胞が存在することがこれまでに示されている。しかしながらこれらの情動要素に対する反応性については近年調べられてきたばかりであり、背側・腹側海馬での比較はこれまでに行われていない。

1-4. 睡眠・安静時の海馬神経活動

動物の睡眠時や安静時には、行動時とは異なる神経活動が見られることが知られている。特に特徴的な脳局所場電位(周辺の神経細胞集団の活動を反映した活動)として高周波帯域の局所場電位であるリップルがある(図 1B)。このリップル発生時には、動物が行動時に活動した細胞群が同期的に再活動することが、特に背側海馬細胞集団の神経活動をターゲットとした研究から知られている(Wilson and McNaughton, 1994; Lee and Wilson, 2002; Dupret et al., 2010)。また、リップル阻害実験や細胞の同期的活動の観察から、リップルとそれに伴う細胞集団の活動は学習や記憶の固定に重要であると考えられている(Girardeau et al., 2009; Ego-Stengel and Wilson, 2010; Jadhav et al., 2012; Papale et al., 2016; Joo and Frank, 2018; Fernández-Ruiz et al., 2019)。さらに近年、腹側海馬細胞も同様に腹側海馬リップル時に発火率を上昇させることが明らかにされている(Sosa et al., 2020)。

1-5. 背側・腹側海馬神経活動の関係

このように、これまで背側・腹側海馬の局所場電位や個々の細胞の発火活動につ

いて様々な研究が行われてきた。中でも、局所場電位については同一個体の背側・腹側海馬から同時に記録を行いその関係性について調べた知見が存在する。例えば先述したリップルについては、背側・腹側海馬間で一部のリップルが伝播すること (Patal et al., 2013) などが報告されている。一方で、個々の細胞の発火活動については、背側海馬については多くの報告が存在するが、腹側海馬については数少ない。これは腹側海馬からの神経活動記録の技術的な難度の高さに起因していると考えられる。さらに、これらの二つの領域の発火活動の同時記録はさらに難度が高く、これまでの研究では別個体からの記録による比較が主であり、同一個体の細胞集団の発火活動の比較はこれまでに殆ど行われていない。

1-6. 本研究の目的

上述したように背側・腹側海馬はそれぞれ空間・情動という異なる要素に関わると考えられてきた。一方でどちらの亜領域においてもリップルと呼ばれる記憶の固定に重要である脳波が観察され、記憶の固定に関わると考えられている。これらの知見を踏まえ、本研究では記憶の固定時に、働きが異なるこれらの亜領域がどのように相互作用を行っているかについて明らかにすることを目的とした。特に本研究では、行動課題と記録手法を構築することで同側の背側・腹側海馬神経細胞の行動課題および睡眠時の活動を計測し、行動課題を行った直後の睡眠時に、行動課題に関わる記憶がどのように両領域でやり取りされるかを解明することを目指した。

2. 方法

2-1. 実験動物

全ての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物への苦痛を最小限に抑えるための最大限の努力のもとに行った(承認番号:P29-7)。

全ての実験には、日本 SLC より購入した Long Evans ラット(3-6 ヶ月齢; 体重 300-450g)を用いた。ラットは自由摂食・摂水下、昼夜逆転した 12 時間の明暗サイクル(7 時消灯、19 時点灯)で個飼いした。1 週間以上飼育し環境に慣れさせた後、行動課題のトレーニングのために、それぞれの体重の 85%を下限として食餌制限を行った。摂水は自由のまま保持した。

2-2. 行動課題

本研究の行動課題の基礎として、床から 74 cm の高さに作成した縦 120 cm、横 90 cm、各経路は 10 cm 幅の八の字迷路を用いた。迷路の表面は ABS 樹脂で覆い、経路は全て 5 cm の壁で囲った。迷路は 185 cm × 215 cm の部屋に置いた。部屋の一部にはレストボックスを置くための棚を置き、異なる一面は暗幕で遮り部屋の明るさを調節した。迷路の経路上の特に重要な場所は、スタート、ステム、ディレイゾーン、リワードポートと名前をつけた。図 2A で示される正解の経路を通過できた際にはリワードポートから 0.1 mL のチョコレートミルクを報酬として提示した。

八の字迷路課題上のディレイゾーンには動物の通過を検知できるセンサを設置し、ディレイゾーンへ進入後に進入側のドアを自動で閉め、10 秒後に進行方向のドアを自

動で開けた。

また、ディレイゾーンの 3.5 cm 先には同様に動物の通過を検知するセンサを設置し、個体毎に左右いずれかの経路のセンサの 7.5 cm 先にエアパフを提示する機器を設置した。エアパフタイミングは電磁弁を開くことで調節し、センサ通過後 500 ms 秒間提示した。

2-3. 行動課題のトレーニング

手術前に、八の字迷路上で課題を遂行できるようにラットのトレーニングを行った。課題のルールは前報 (Wood et al., 2000; Ito et al., 2015) と同様に、ディレイゾーンで 10 秒間ラットに待機させるディレイを追加してある。トレーニングはエアパフ無しで行った。最初の 2-3 日は、ラットを八の字迷路の環境に慣らすためのハビチュエーションとして、ランダムにチョコレートミルクを迷路上に散布した状態で、迷路上を 20 分間自由に動き回らせた。ハビチュエーション完了後に、八の字迷路上で課題のトレーニングを開始した。

トレーニングの初めは、まずディレイなしで行った。ラットがスタートからいずれかのリワードポートに移動するまでを 1 トライアルとした。ラットがスタートからステム、ディレイゾーンを通過して逆側のリワードポートに到達した場合に、リワードポートから報酬を獲得できる。報酬獲得後には連続してリワードポートと同じ側のスタートに移動し、次のトライアルを開始する。次の報酬はラットがディレイゾーンに進入したことをセンサが感知したタイミングに自動で提示される。次のトライアルでは先ほどと逆側のリワードポートに到達すると報酬を獲得できる。トレーニング時にはラットの逆走を防ぎ、正しい経路を

獲得できるよう手やプラスチックの板で誘導を行った。トレーニング時には以上の工程を 20 分間でできる限り繰り返した。ディレイ無しで 2 週間程度トレーニングを行い、正解率が 8 割程度に到達した後に、ディレイ有りと同様にトレーニングを行った。ディレイ有りで 1 週間程度トレーニングを行い、正解率が 8 割程度になったことを確認できたら、トレーニング完了とした。トレーニング後には行動課題迷路外のレストボックス (33 × 33 cm) に 20 分間ラットを置き、レストボックスにも慣れさせた。

2-4. 電極セットの作成

海馬からの電気生理記録には、シリコンプローブ電極 (背側海馬; Buzsaki32, Neuronexus、腹側海馬; Buzsaki64L, Neuronexus) を使用した。各シリコンプローブはそれぞれ 4 本、8 本のシャンクからなり、各シャンクにはそれぞれ 8 つの記録部位が存在する。またシリコンプローブを保持し、高さを調節できる部品 (マイクロドライブ) を 3D 設計ソフト (Fusion360, Autodesk) を用いて設計し、3D プリンタ (Form2, Formlabs) を用いて製作を行った。

2-5. マイクロドライブ埋め込み手術

ラットは濃度 3% のイソフルラン吸入麻酔で導入後、0.5-2% で維持した。三点固定装置 (SR-6R-HT, Narishige, Tokyo, Japan) に頭部を固定して頭皮を切開し、頭蓋骨を露出した。頭蓋骨に電動ドリル (SD-102, Narishige, Tokyo, Japan; Minimo ONE SERIES ver.2, C2012, Minitor Co., Ltd, Tokyo, Japan) で 1mm の穴を開け、ドライブの固定のために 6 本のステンレスビス (stem width: 1.4 mm, stem length: 3 mm, Stainless

steel screw M1.4×3.0, 42617687, MonotaRO, Hyogo, Japan)を頭蓋骨に埋め込んだ。さらに 2 本のステンレスビスを小脳に埋め込み、グラウンドと参照電極とした。続いて、脳の右側に電極を刺入するため、背側海馬については bregma から AP 方向に-3.5mm、ML 方向に 2.7mm の位置を中心に ML 方向に幅 1mm、AP 方向に 0.5mm 程度の楕円形に穴を開けた。同様に、腹側海馬については bregma から AP 方向に-4.8mm、ML 方向に 5.0mm の位置を中心に ML 方向に幅 0.5mm、AP 方向に 2mm 程度の楕円形に穴を開けた。それぞれ硬膜を剥離し、マイクロドライブに貼付した電極を刺入した後、露出した脳表をゲル (Neuro seal: 塩化カルシウム水溶液とアルギン酸ナトリウム水溶液を混和させたもの) で保護した。その後電極部分はパラフィンとミネラルオイルの混合物 (5 g paraffin / 10 mL mineral oil) で保護し、接着剤 (スーパーボンド C & B、サンメディカル) および歯科用セメント (RE-FINE BRIGHT, 03-4601, YAMAHACHI DENTAL MFG., CO., Aichi, Japan) を用いてマイクロドライブを頭蓋骨上に固定した。グラウンド線および参照電極線はピンヘッド、ピンソケットを介してシリコンプローブの各線につないだ。マイクロドライブの破損を防ぐために、銅メッシュで作成した保護カバーを頭蓋骨に接着剤及びセメントを用いて固定した。

2-6. 電極の位置調整

ラット頭上のマイクロドライブは、アナログーデジタル変換器 (Cereplex M, Blackrock)、コミュニケーターを介し、データ取り込み装置 (Cereplex direct, Blackrock) に接続した。マイクロドライブ、アナログーデジタル変換器およびケーブルはラットが行動課題を問題なく遂行できる重さである。電極の位置調整は台座上に置いたレストボックス内で行った。手術後、各シリコンプローブを 1 日辺り最大 280 μ m ずつ、一週間以上

かけて海馬の細胞層に到達するまで下ろした。海馬の細胞層への到達は、局所場電位 (LFP; local field potential) と unit activity を元に推定した。シリコンプローブが細胞層に近づいたら、電極を留め、数日間に渡り記録を行った。

2-7. 電気生理学的記録

海馬に埋めた電極から安定してスパイクが確認できるようになった後、神経活動の記録を開始した。記録を開始する前に、ラットは数日間再トレーニングを行った。うち数日間はマイクロドライブにケーブルをつないでトレーニングを行い、記録状況にラットを慣れさせた。

レコーディングはラットの行動課題の成績がトレーニング完了と同程度に到達し、電極から良くユニットが確認できてから開始した。レコーディング時には、エアパフがありの条件でラットは 1 時間行動課題を行った。エアパフはラットの通過を検知するセンサが反応した後 500m 秒間提示した。エアパフの位置は個体毎に左右いずれか決定し、反対側の経路では同様のセンサおよび機器を設置し、同様に稼働させたがエアパフは提示しなかった。エアパフ強度は正解率の低下が見られるが完全に課題は止めない程度に、個体毎に 0.05~0.45MPa の間で圧力調整器を用い調整した。また、行動課題前後にはレストボックス内にラットを置き、1 時間ずつ記録を行った。

LFP の記録は 2kHz のサンプリングレートで行い、500Hz のローパスフィルタをかけた。また、スパイクの検出のために 30kHz のサンプリングレートでの記録を同時に行った。ラットの場所を検知するために、頭部のマイクロドライブには赤色 LED を取り付けた。LED の場所を検出するために天井に取り付けたビデオカメラを用いて 25Hz で撮影を行った。

2-8. 電極位置確認のための組織学的解析

脳に挿入した電極位置の確認は、電極に電流を流すことで跡を付け、灌流固定を行った後に脳を取り出し、薄層切片にして染色することで確認した。

電極跡を付けるために、神経活動の記録最終日にラットを濃度 3%のイソフルラン吸入麻酔で導入後、0.5-2%で維持し、三点固定装置に固定した。続いて、ラットの肛門をマイナス、電極の各シャンク先端の記録部位に対応する基板の位置をプラスとして、 $5\mu\text{A}$ で 10 秒間電流を流した。終了後、麻酔から回復させ、翌日に灌流固定を行った。

灌流固定の際には、ラットにウレタン麻酔 (10 mg/kg) を腹腔内投与した後に開胸した。続いて、左心室から PBS を灌流して血を抜き、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (PFA; pH7.4) を灌流した。頭部を切り落とし、脳を摘出した後に、4%PFA に 4°C 下で一晩浸して後固定を行った。

薄層切片を作成するにあたり、まず 4°C 下で 20%スクロース溶液に一晩以上つけ、続いて 30%スクロース溶液に一晩以上つけることで脱水処理を行った。脳をドライアイス中で凍結し、マイクローム SM2010R (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ $60\mu\text{m}$ の coronal 切片を作成した。

続いて薄層切片の染色を行った。スライドガラスに脳薄層切片を貼り付け、マウンティング溶液 (0.2 %ゼラチン/ PBS) を滴下し、一晩以上風乾した。続いて、Cresyl violet 染色を行った。まず、標本を貼り付けたスライドガラスを蒸留水に浸して親水化し、50、60、70、80、90、100%エタノールに浸して脱水を行った。キシレンに 2 分間浸して脱脂し、100、90、80、70、60、50%エタノールに 10 秒以上浸して再び親水化した。続いて蒸留水に浸した後、暗所にて cresyl violet 液に 10 分間浸して染色を行った。十分染色されたことを確認し、95 % 酢酸エチル溶液、100 % エタノールに浸して脱色した。再度キシレンに浸した後、疎水性封入剤 (PARAmount-D, Falma, Tokyo, Japan) で封入した。

作成した薄層切片は、光学顕微鏡 (All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X710, Keyence Corporation, Osaka, Japan) を用いて可視光で撮影した。撮影された画像デー

タを元に各電極の記録箇所を特定した。

2-9. スパイクソーティング

スパイクソーティングは電気生理記録の終了後に、30kHz のサンプリングレートで取得したデータを元に、kilosort (<https://github.com/cortex-lab/KiloSort>) および Phy (<https://github.com/kwikteam/phy-contrib/blob/master/docs/template-gui.md>) を用いて行った。クラスタリングはまず MATLAB 2018a (Math Works, MA, USA) 上で kilosort を用いて全自動で細胞毎の発火を分類し、続いて phy を用いて波形を元に細胞の発火とノイズを分けた。また、スパイクタイミングの自己相関関数および相互相関関数を基準とし、詳細な判別を行った。

2-10. 走行軌跡の解析

左右の経路を取っている時間を左右の正解トライアルと定義した。不正解のトライアルは、チョイスポイントにおいて正解の経路と反対側の経路を選択した場合と定義した。不正解のトライアルの次のトライアルでは、スタートの場所を元に次の正解の経路を定義した。定量化のために、迷路の各通路の中心線を基準とし、ラットの軌跡をこれに投影することで線形化した。ラットの各タイミングでの走行速度は前後 5 フレーム (~200msec) の位置を元に算出した。

2-11. 個々の細胞の空間依存的な発火活動についての解析

個々の細胞の発火活動を解析するにあたり、細胞が発火した場所は、ラットの軌跡同様に迷路上の通路の中心線に投影した。左右の各経路の 10 cm のビン毎の平均発火率の分布は、各ビン内での発火回数を滞在時間で割ることで算出した。この平均発

火率は $\sigma = 10 \text{ cm}$ のガウシアンフィルタで平滑化した。これを元に各細胞が空間依存的な発火活動を示す場所細胞であるか否かを定義した。各細胞は、(1)ピークの発火率が 1.5Hz 以上であり、(2)ピークの発火率が、最大発火率を示すビンを除いた発火率分布の平均+2SD よりも大きい事、の 2 つの条件を満たす場合に場所細胞と定義した。2 つ目の条件は、発火率が空間選択的に変化しているかを確認するために用いた。最大の発火率を示した場所を、特に場所受容野の中心と定義し、最大発火率の 30%以上の発火率を示す隣接したビンの範囲を場所受容野と定義した。このクライテリアで、左右両方の経路に場所受容野を持つ細胞、片方のみに場所受容野を持つ細胞の両方が存在した。空間情報量の解析では 1 つの細胞から二つの場所受容野が定義された場合は、これらを別々に解析した。

2-12. 個々の細胞の情動要素に対する反応性についての解析

報酬に対する反応性および嫌悪刺激に対する反応性は独立に解析を行った。各要素に対して興奮あるいは抑制される細胞を同定するにあたり、エアパフの場合はエアパフが提示されるためのセンサが反応する前後 4 秒、報酬の場合は報酬獲得のタイミングを検出するためのセンサが反応する前後 5 秒の平均発火率を 100m 秒ごとに算出し、Mann-Whitney rank sum test を用いて比較した。これによって算出された p 値が 0.05 以下の場合に各刺激への反応性細胞であると定義した。また、反応性細胞は、前後の発火率を比較し、発火率が上昇する場合は刺激によって興奮する細胞、下降する場合は抑制される細胞と分類した。

2-13. 局所場電位の解析

局所場電位の解析は、各領域に挿入した電極の、シャンク先端に存在するチャンネルを用いて行った。リップルは、各チャンネルで記録された局所場電位に 150-250 Hz の

バンドパスフィルタをかけて検出した。二乗平均平方根からパワーを求め、この平均と標準偏差を算出した。そして、平均から 3 SD 以上高いパワーの値を取った時間が 20 m 秒以上となったものを抽出し、リップルと定義した。

2-14. リップル中の発火活動の解析

リップル中の各細胞の発火率変化について解析を行った。リップルのピーク時を基準とし、前後 1 秒間の発火率を 100 m 秒のビン毎に算出した。また、細胞間での比較のために各細胞の発火率を z スコア化した。

3. 結果

3-1. 報酬および嫌悪刺激を伴う行動課題の構築

まず、空間および情動に関わる要素に対して、背側および腹側海馬がどのように活動変化を示すかを調べるための行動試験系を構築した(図 2A)。行動試験の基礎としては、空間学習課題の一つである八の字迷路課題(Wood et al., 2000; Ito et al., 2015)を用いた。本課題は、スタートと反対側の報酬ポートに到達すると報酬を獲得できるという課題である。また、本課題を海馬依存とするために、分岐点到達時にラットをディレイゾーンに閉じ込めて 10 秒後に経路を選択させた。情動に関わる要素としては報酬を提示するほかに、左右いずれかの経路では嫌悪刺激の 1 つであるエアパフを提示した。また、本課題の前後にはレストボックスにラットを置き、睡眠安静時の神経活動についても続いて記録を行った(図 2B)。まず、本行動課題におけるラットの行動について解析を行うため、経路の分類を行った。スタート地点を開始とし、いずれかの報酬ポートに到達するまでを 1 回のトライアルと定義し、以降の解析に用いた。図 2C では、本行動課題遂行時の、ラット走行経路の代表例を示す。スタートと反対側の報酬ポートに到達する正解の経路を取る正解トライアルと、スタートと同じ側の報酬ポートに到達する不正解の経路を取る不正解トライアルの両方が観察された。続いて、図 2D では同じスタートから始まる全トライアルのうち正解トライアルの割合を成功率とし算出し、エアパフの有無で差があるかについて解析を行ったところ、エアパフ有りの経路では正解率の有意な低下が見られた($p = 0.013$, $n = 51$ days from 10 rats, paired t -test)。また、正解トライアルについて各場所での平均走行速度を算出した所、エアパフの有無によって有意な差は認められなかった。以上の結果から、情動要素および空間学

習の両要素を含む行動試験系を構築できたと考えられる。

3-2. 背側・腹側海馬からの同時記録手法

これまで、背側海馬および腹側海馬の神経活動を同時に計測した例は殆ど存在しない。その原因に、これらの脳領域からの神経活動計測を同時に行うことの難しさが挙げられる。そこで、本研究ではまず多数の電極が存在するシリコンプローブという電極を使用した(図 3A)。また、これを保持し、標的部位まで刺入することが可能であるマイクロドライブを設計し、3D プリンタを用いて独自に製作を行った(図 3B)。これらを組み合わせて作成した記録デバイスを図 3C で示すように同側の海馬に埋め込みを行った。これらの手法を用いることでラットの同側の背側・腹側海馬から神経活動の記録を同時に行うことが可能となった(図 3D)。また、実際に記録を行った電極部位は、神経活動記録終了後に組織学的解析を行い確認した(図 3E, F)。

3-3. 情動に関わる要素に反応性を示す細胞が存在する

まず、行動課題中の情動要素に対する反応性が背側・腹側海馬において異なるかについて検討を行った。エアパフに対する反応性については、ラットの通過を感知しエアパフを提示するセンサの反応タイミング前後 4 秒間の発火を抽出し、解析を行った。各細胞の発火率を 100m 秒毎に算出し、Mann-Whitney rank sum test を用いて比較し、有意な差が認められたものを反応性細胞と定義した(図 4A, C)。また、反応性細胞のうち、エアパフ提示前後で発火率が上昇したものをエアパフ興奮性、下降したものをエアパフ抑制性細胞とした。同様に報酬の獲得タイミングを検知するセンサの

反応タイミング前後 5 秒間の発火について同様に検討を行い、報酬興奮性および報酬抑制性細胞を定義した(図 4B、D)。続いて、背側、腹側海馬における各反応性細胞の割合について比較するために、エアパフ、報酬提示タイミング前後の発火率変化の有意性を示す p 値について、 $-\log_{10}(p)$ をそれぞれ算出し、エアパフ反応度合い、報酬反応度合いを定義した。これを元に領域毎に 2 次元空間上にプロットし(図 4E)、各細胞をエアパフ反応性、報酬反応性、両要素反応性、反応性無しの 4 つに分類した。そして反応性細胞の割合を算出したところ、背側海馬において反応性細胞の割合が多く、腹側海馬における分布とは有意な差があった(図 4F)。以上の結果から、本行動課題において情動要素に関わる情報をコードする細胞が、背側海馬により多いことが示された(補足図 1)。

3-4. 空間に対して反応性を示す細胞が存在する

次に、空間に対する反応性が背側・腹側海馬において異なるかについて検討を行った。過去の知見において、場所依存的な活動は同じ経路通過時でも課題の状況によって異なることが知られている(Wood et al., 2000)。そこで本研究においても左右のトライアルを分離して場所依存的な発火活動の解析を行った。左右のトライアルを走行している際の各場所における発火率を算出し、ガウシアンフィルタをかけた。これによって求めた発火率について、①最大発火率が 1.5 Hz 以上、②最大発火率が、最大発火率を示すビンを除いたビンの発火率の平均+2SD 以上、の 2 つを満たす細胞を場所依存的な発火活動を示す細胞すなわち場所細胞と定義した。多くの細胞は特に片側のトライアルにおいて高い発火率を示した(図 5A, B)。また、各場所細胞が持つ

空間情報量を算出し、背側、腹側海馬間で比較した。空間情報量は、その細胞の活動から動物の位置を類推できる度合いを反映した値であり、より特定の場所で高い発火率を示す場合に高くなる。するとこの結果は、背側海馬で有意に高かった(図 5C)。また、各領域で定義された場所細胞の割合を算出したところ背側海馬で有意に高かった(図 5D)。以上の結果から、本行動課題において空間に関する情報が、背側海馬によりコードされていることが示唆された(補足図 1)。

3-5. 背側・腹側海馬間のリップル同期度合いは低い

睡眠時の背側・腹側海馬神経活動を比較するにあたって、リップルという 150-250 Hz の高周波帯域の局所場電位に着目した(Carr et al., 2011)。リップルは新奇環境探索後にその頻度が上昇すること (Eschenko et al., 2008) や、これを阻害することで行動課題の成績が低下すること(Girardeau et al, 2009)、リップルを延長することで課題の成績が向上すること(Fernández-Ruiz et al, 2019)などから記憶の固定化に関わると考えられている。

このリップルについては腹側海馬においても観察されることが知られており、背側・腹側海馬間で一部のリップルが伝播すること(Patal et al., 2013)も過去の知見で明らかにされている。そこでまず、本行動課題遂行後の睡眠安静時にも、背側・腹側海馬でリップルが観察されるか、及びその関係性について検討を行った。本研究では背側・腹側海馬にそれぞれ 4 本、8 本のシャンクを持つ電極を埋め込んでいる。そこでまず、それぞれのシャンク先端の記録部位で記録された局所場電位のうち 150-250 Hz 帯域の局所場電位を取り出し、リップルの定義を行った(図 6A)。続いて、各電極で記

録されたリップルの前後 500 msec 以内にリップルが観察される確率を同時発生確率として算出した。すると、背側海馬内に比べて背側腹側海馬間では有意に同時発生確率が低かった(図 6B; 背側海馬内 vs 腹側海馬内: $p = 0.18$, 腹側海馬内 vs 背側腹側海馬間 : $p = 0.34$, 背側海馬内 vs 背側腹側海馬間 : $*p = 0.012$, $n = 4$ rats, paired t -test with Bonferroni corrections.)。この結果から、背側海馬内では高いリップルの同期度合いが見られる一方で背側・腹側海馬の間では同期度合いが低いことが示された。すなわち、リップルは海馬全体で同期して生じるわけではなく、独立に生じるものが存在するということが示唆された。

3-6. 各領域リップル発生時の発火活動変化

背側海馬リップル発生時に背側海馬細胞の発火活動が観察されること、また腹側海馬リップル発生時に腹側海馬細胞の発火活動が観察されることはこれまでに知られている。しかし、背側海馬リップル発生時の腹側海馬神経細胞の発火活動や、腹側海馬リップル発生時の背側海馬神経細胞の発火活動はこれまでに調べられていない(図 1B)。そこでまず、各領域リップル発生時の個々の細胞の発火活動について検討した。

背側海馬細胞の、背側海馬リップルピーク時前後 1 秒間の発火率を 100m 秒毎に算出したところ、リップルのピーク付近で発火率が上昇する細胞が観察された(図 7A)。一方で同じ背側海馬細胞について、腹側海馬リップル発生時の発火率を算出したところ、発火率が上昇する様子は見られなかった(図 7B)。同様に、腹側海馬細胞について検討を行った。すると、背側海馬リップルのピーク付近で、腹側海馬細胞は

発火率を低下させる様子が見られた(図 7C)。一方で、腹側海馬リップルのピーク付近では、腹側海馬細胞は発火率を上昇させた(図 7D)。これらのことから、一部の細胞がリップル発生時に発火率を変化させることが示された。

3-7. 腹側海馬細胞は背側海馬リップル時に活動が抑制される

続いて、海馬の細胞集団全体でリップル時に発火率がどのように変化するかについて検討を行った。各細胞の発火率を z スコア化し、平均を取った。すると、背側海馬細胞集団は背側海馬リップルピーク時に発火率を上昇させる様子を見せた(図 8A)。特に、リップルピーク時の z スコア化した発火率は有意に 0 より大きかった(図 8E)。一方で、腹側海馬リップル時には背側海馬は有意な発火率変化を見せなかった(図 8B, E)。また、腹側海馬細胞集団についても同様に解析を行った。すると、腹側海馬細胞集団は背側海馬リップルピークにおいて有意に発火率を低下させた(図 8C, E)。一方で腹側海馬リップルピークにおいて有意に発火率を上昇させた(図 8D, E)。この結果から、背側、腹側海馬細胞集団は各領域のリップル発生時には発火率を上昇させることが、一方で他方の発火率は上昇させないことが示された。また特に腹側海馬細胞集団は背側海馬リップル時には発火率を低下させることを明らかにした。すなわち、リップルとそれに伴う細胞集団の発火活動は背側、腹側海馬内では同時に生じるが、互いの細胞集団は発火させずむしろ抑制させうることを示唆した(補足図 2)。

3-8. 腹側海馬細胞は特に独立に生じる背側海馬リップル時に抑制される

図 6 で示したようにリップルは背側、腹側海馬間で同期するものと同期しないもの

に分類できる。そこで、背側、腹側海馬間で同期したリップルと、独立に生じるリップルで細胞の活動が変化するかについて解析を行った。

背側海馬リップル発生時の背側海馬神経細胞集団の発火活動について解析を行ったところ、独立、同期リップル共にピーク付近で発火率を有意に上昇させた(図 9A, E)。一方で、腹側海馬の独立リップル発生時には発火率の有意な変化は見られなかったが、同期リップル発生時には発火率の有意な上昇が見られた(図 9B, E)。また、腹側海馬細胞集団は背側海馬の独立リップル時には有意な発火率の低下が見られたが、同期リップル時には有意な変化は見られなかった(図 9C, F)。一方で腹側海馬リップル時には独立、同期リップル共に発火率の有意な上昇が見られた(図 9D, F)。この結果から、腹側海馬神経細胞は背側海馬のみでリップルが発生しているとき特異的に発火率が低下することが明らかになった。すなわち図 8 で示された発火率変化は特に独立リップル時に顕著に見られることが推察される。

3-9. 情動要素に反応性を持たない腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制される

一般に睡眠・安静時に観察されるリップル発生時には、直前の行動時に活動した細胞集団が同期的に活動することが知られている。そこで、本研究の睡眠・安静時の発火活動が直前の行動課題遂行中の発火活動と関係が見られるかについて検討した。

本行動課題では、情動要素に反応性を示す細胞が一部存在することを図 4 で示した。そこで、情動要素への反応性で睡眠・安静時の発火活動が変化するか解析を行った。すると、背側、腹側海馬の各反応性細胞は、各領域リップル時に有意に発火

率を上昇させた(図 10A, D, E, F)。一方で、背側海馬細胞のうち報酬反応性の細胞のみは腹側海馬リップル時に発火率を有意に低下させた(図 10B, E)。また、腹側海馬細胞のうち情動要素に反応性を持たない細胞のみは、背側海馬リップル時に有意に発火率を低下させた(図 10C, F)。以上の結果から、直前の行動時の情動要素に対する反応性によって他領域リップルから受ける制御が異なることが示唆された。

3-10. 場所細胞でない腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制される

本研究において、空間依存的な発火活動を示す細胞(場所細胞)が一部存在することを図 5 で示した。そこで、場所細胞か否かで睡眠・安静時の発火活動が変化するか解析を行った。すると、背側海馬の各細胞は、背側海馬リップル時に有意に発火率を上昇させた(図 11A, E)。一方で、背側海馬細胞のうち場所細胞は腹側海馬リップル時に発火率を有意に上昇させた(図 11B, E)。また、腹側海馬の場所細胞以外の細胞は、腹側海馬リップル時に有意に発火率を上昇させた(図 11D, F)。一方で、腹側海馬細胞のうち場所細胞ではない細胞は、背側海馬リップル時に有意に発火率を低下させた(図 11C, F)。以上の結果から、直前の行動時の場所に対する反応性によって他領域リップルから受ける制御が異なることが示唆された。

4. 図

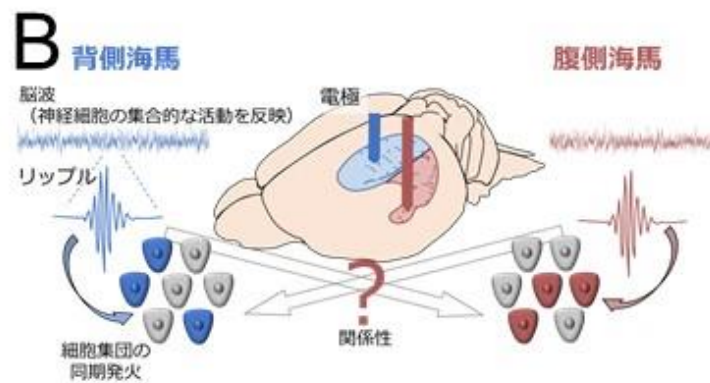
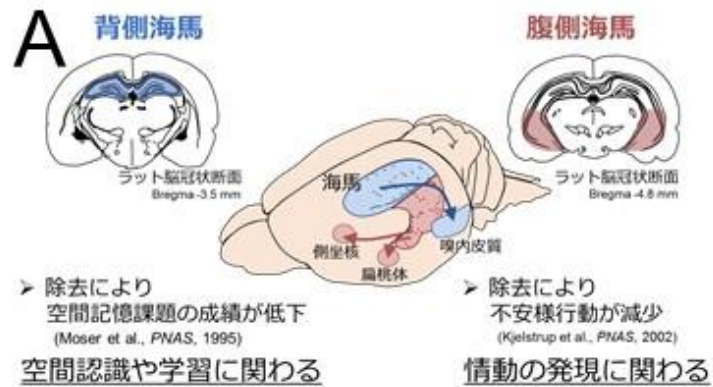


図 1 背側・腹側海馬の関係性

- A) 海馬は機能、構造共に異なる背側・腹側海馬に分けることができる。
- B) これまでの研究では、背側・腹側海馬においてリップルという局所場電位が観察されること、またこの時に各領域内の細胞集団が活動することが知られてきた。しかし、これらの関係性については殆ど調べられていなかった。

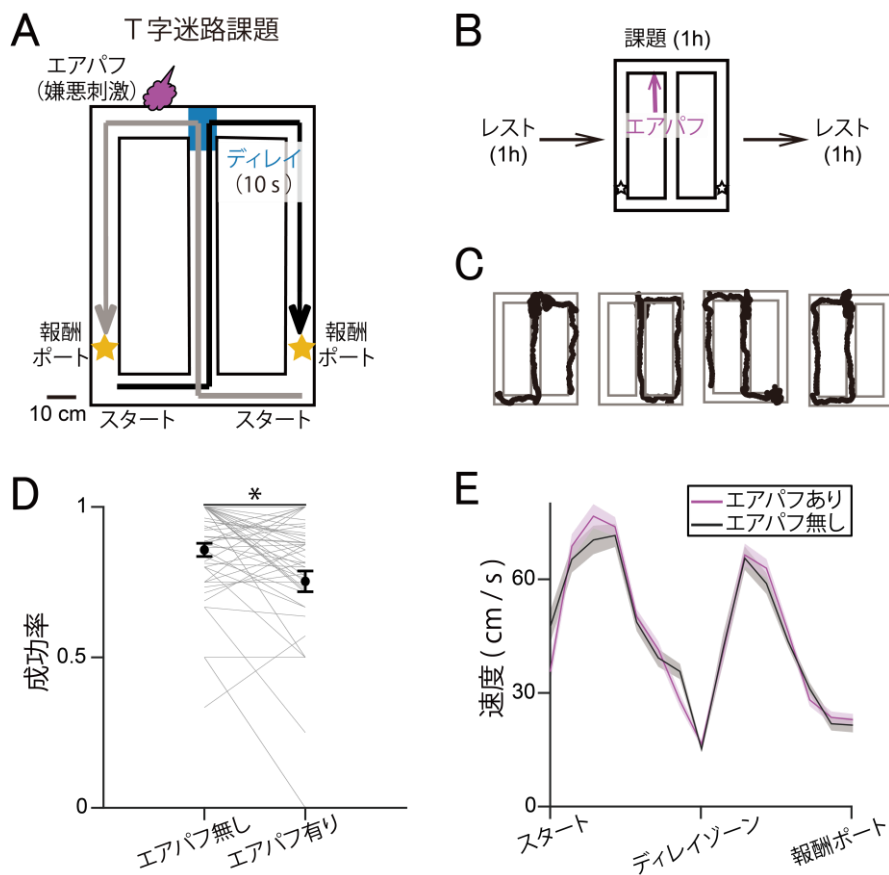


図 2 報酬および嫌悪刺激を伴う行動課題の構築

- A) 行動課題の模式図。基礎として八の字迷路課題を用いた。海馬依存の空間記憶課題とするために、中央上部において 10 秒間のディレイを設定した。黒、灰色の矢印で描かれているように、スタートと反対側の報酬ポートに移動した場合に報酬を獲得できる。左右いずれかの経路のディレイゾーン直後には嫌悪刺激としてエアパフ刺激(強い空気を吹きかける刺激)を提示した。
- B) 実験パラダイム。A で示す行動課題を 1 時間行い、その前後 1 時間レストボックスにラットをおき睡眠安静時の神経活動を記録した。

- C) 行動課題における軌跡の代表例。スタートから報酬ポートまでの経路を 1 トライアルとして定義し、以降の解析に用いた。左から、左側のスタートからの正解トライアル、不正解トライアル、右側のスタートからの正解トライアル、不正解トライアル。
- D) エアパフ有り、無しの各経路について、成功率(正解トライアル数/全体のトライアル数)を算出した。エアパフ有りの経路で有意に成功率が低かった。 $*p = 0.013$, $n = 51$ days from 10 rats, paired t -test.
- E) エアパフ有り、無しの各経路における走行速度。

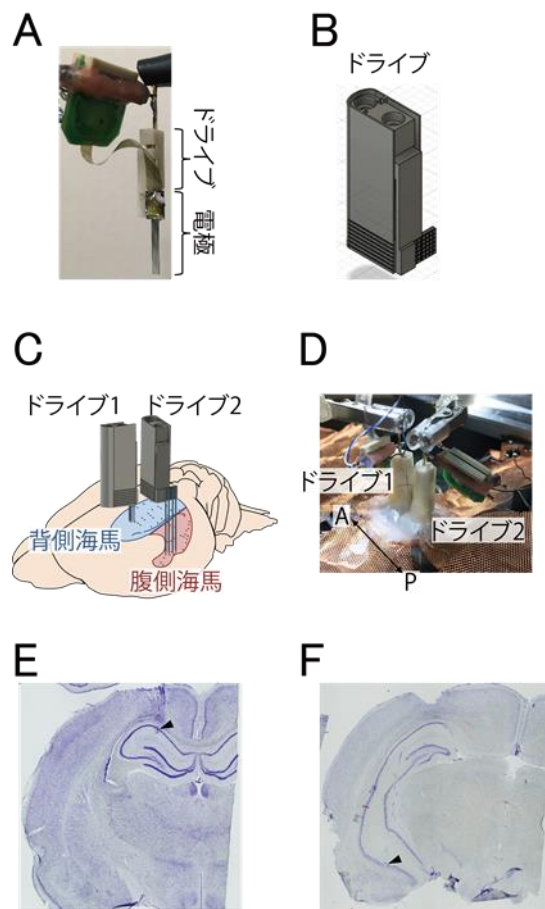


図 3 背側・腹側海馬からの同時記録手法

- A) 記録に使用した電極セット。シリコンプローブと呼ばれる電極を、これを保持し刺入できるマイクロドライブに貼付して使用した。
- B) マイクロドライブの 3D 設計図。3D プリンタを用いて作成を行った。
- C) 背側・腹側海馬へのドライブ埋め込みの模式図。2 つの電極を同側の背側・腹側海馬に埋め込んだ。
- D) 実際にドライブ埋め込み手術を行っている様子。
- E) 記録後に確認された背側海馬の電極跡。

F) 記録後に確認された腹側海馬の電極跡。

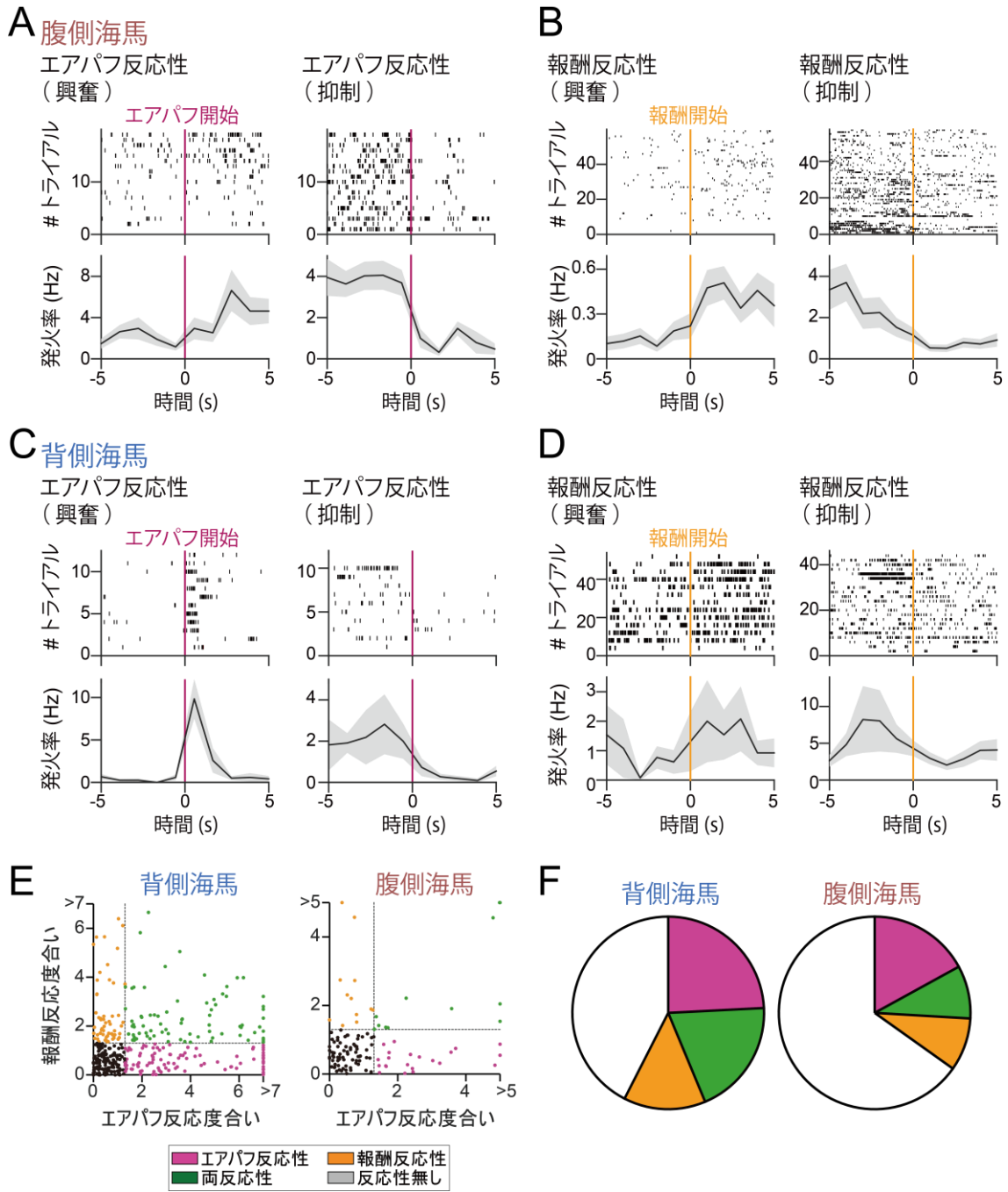


図 4 情動要素に反応性を示す細胞が背側・腹側解剖に存在する

A) 腹側海馬において観察されたエアパフ提示前後で発火率を変化させた細胞の例。

(左上)各トライアルにおける発火タイミングを、エアパフ開始タイミングを 0 としてラスタープロットを示した。(左下)上のラスタープロットを元に 1 秒ごとの平均発火率を示した。エアパフ提示前後で有意に発火率が上昇していた。(右)エアパフ提示前後で発火率が低下した細胞について、左と同様に示した。

- B) 腹側海馬の報酬反応性の細胞について、報酬の獲得開始タイミングを 0 秒として A と同様に示したもの。
- C) 背側海馬のエアパフ反応性の細胞について A と同様に示したもの。
- D) 背側海馬の報酬反応性の細胞について B と同様に示したもの。
- E) 各細胞のエアパフ、報酬提示前後の発火率変化の有意性を示す p 値の $-\log_{10}(p)$ をそれぞれ反応度合いとし、プロットを行った。この値を元に各要素へ反応性であると定義された細胞は各色でプロットした。
- F) 背側、腹側海馬で観察された各反応性細胞の割合。これらの割合には有意な差が見られた。* $p = 6.8 \times 10^{-5}$, $n = 98$ airpuff responsive cells, 56 reward responsive cells, 79 both stimuli responsive cells, 172 nonresponsive cells from dorsal hippocampus, $n = 23$ airpuff responsive cells, 12 reward responsive cells, 12 both stimuli responsive cells, 88 nonresponsive cells from ventral hippocampus, chi-square test.

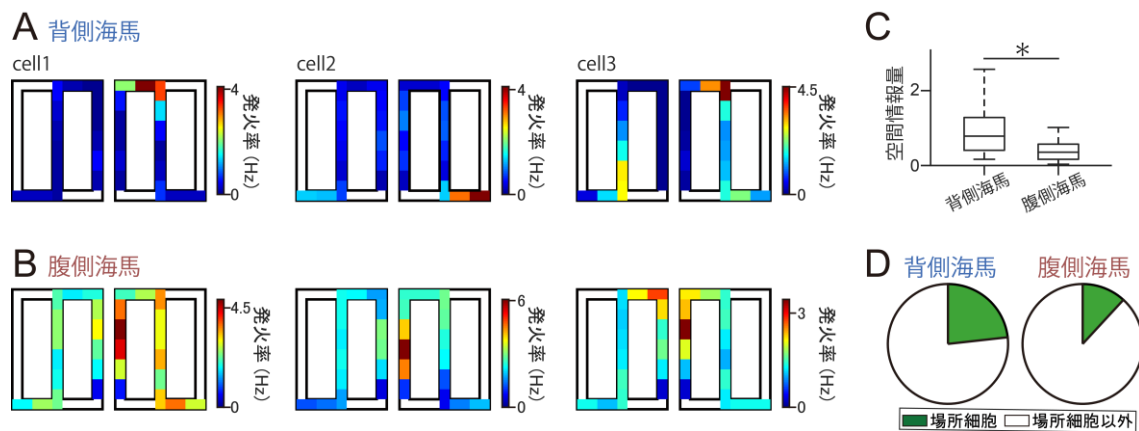


図 5 場所依存的な発火活動を示す細胞が背側・腹側海馬に存在する

- A) 背側海馬で観察された、場所依存的な発火活動を示す細胞。各場所での平均発火率をカラーマップで示した。左右のトライアルを分割して示した。
- B) 腹側海馬で観察された、場所依存的な発火活動を示す細胞。
- C) 背側、腹側海馬で場所細胞と定義された細胞の空間情報量。背側海馬において空間情報量が有意に高かった。 $p = 3.3 \times 10^{-5}$, $n = 117$, 20 place fields each, Student's *t*-test.
- D) 背側、腹側海馬で場所細胞と定義された細胞の割合。背側海馬において有意に高かった。 $*p = 0.0022$, $n = 102$ place cells, 337 non-place cells from dorsal hippocampus, 55 place cells, 56 non-place cells from ventral hippocampus, chi-square test.

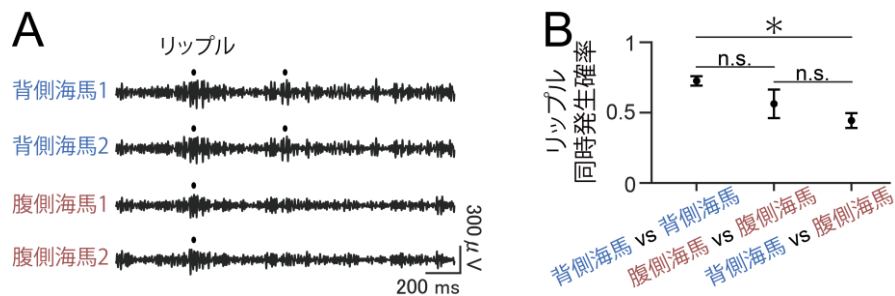


図 6 背側・腹側海馬間のリップル同期度合いは低い

A) 背側、腹側海馬で記録された局所場電位のうち、150-250 Hz 帯域の局所場電位を抽出したもの。これを元にリップルのピークを定義した(黒点の位置)。本研究では背側海馬に 4 本、腹側海馬に 8 本の電極を埋め込んでおり、このそれぞれについてリップルを定義した。

B) 各領域の電極間のリップル同期度合い。±500 msec 以内にリップルが生じた場合に同期していると定義した。背側海馬内の同期度合いに比べて背側 - 腹側海馬間では有意に同期度合いが低かった。背側海馬内 vs 腹側海馬内: $p = 0.18$, 腹側海馬内 vs 背側腹側海馬間 : $p = 0.34$, 背側海馬内 vs 背側腹側海馬間 : $*p = 0.012$, $n = 4$ rats, paired t -test with Bonferroni corrections.

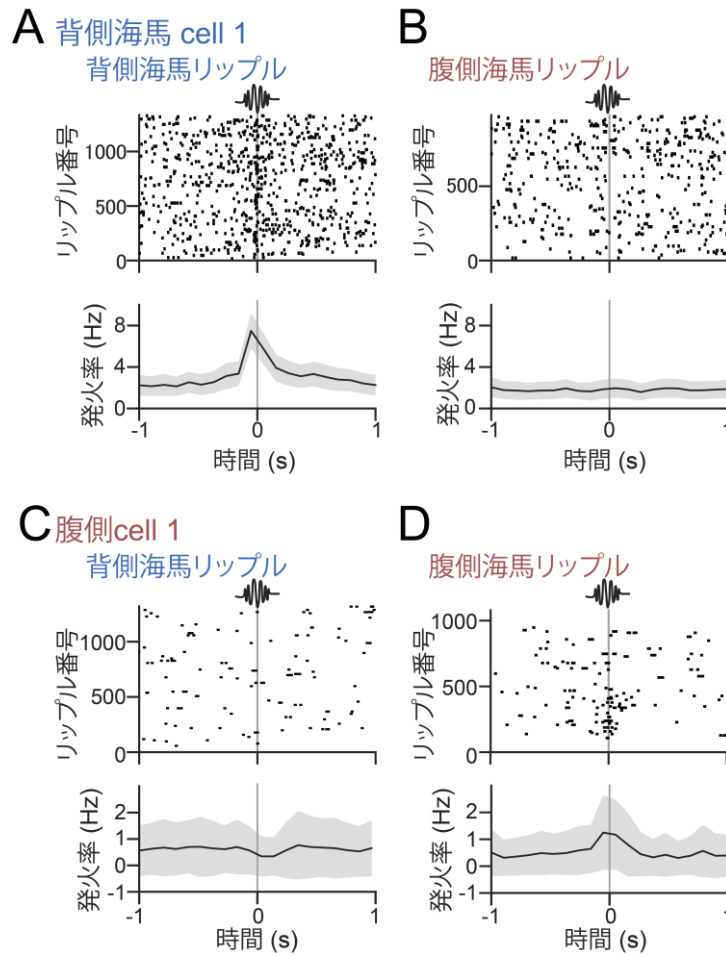


図 7 各領域リップル発生時の発火活動変化

- A) 背側リップル発生時の背側海馬代表神経の発火活動変化。(上)背側海馬リップルのピークを 0 秒とし、その前後 1 秒間に記録された発火タイミングのラスタープロット。(下)上のラスタープロットを元に算出した 100 m 秒ごとの発火率。
- B) A と同じ細胞について、腹側海馬リップルピーク時を 0 秒として同様に示した。
- C) 背側リップル発生時の腹側海馬代表神経の発火活動変化を A と同様に示した。
- D) C と同じ細胞について、腹側海馬リップルピーク時を 0 秒として同様に示した。

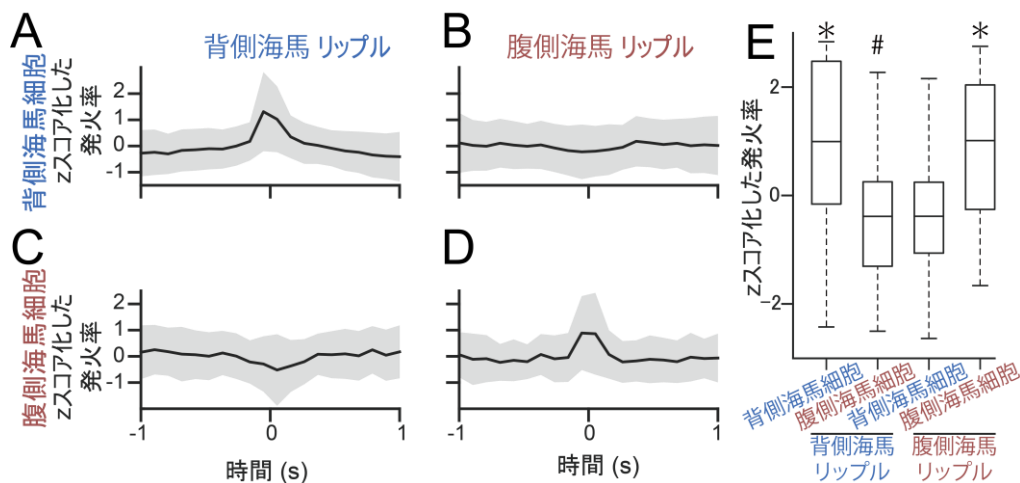


図 8 腹側海馬細胞は背側海馬リップルピーク時に発火率が低下する

- A) 背側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。
- B) 腹側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。
- C) 背側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。
- D) 腹側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。
- E) A – D で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を抽出して示す。

背側海馬リップル時の背側海馬細胞 : * $p = 4.2 \times 10^{-63}$, $n = 439$ cells; 背側海馬リ

ップル時の腹側海馬細胞 : # $p = 9.5 \times 10^{-6}$, $n = 152$ cells; 腹側海馬リップル時の

背側海馬細胞 : $p = 0.53$, $n = 439$ cells; 腹側海馬リップル時の腹側海馬細胞 :

* $p = 1.4 \times 10^{-7}$, $n = 152$ cells, one sample t-test.

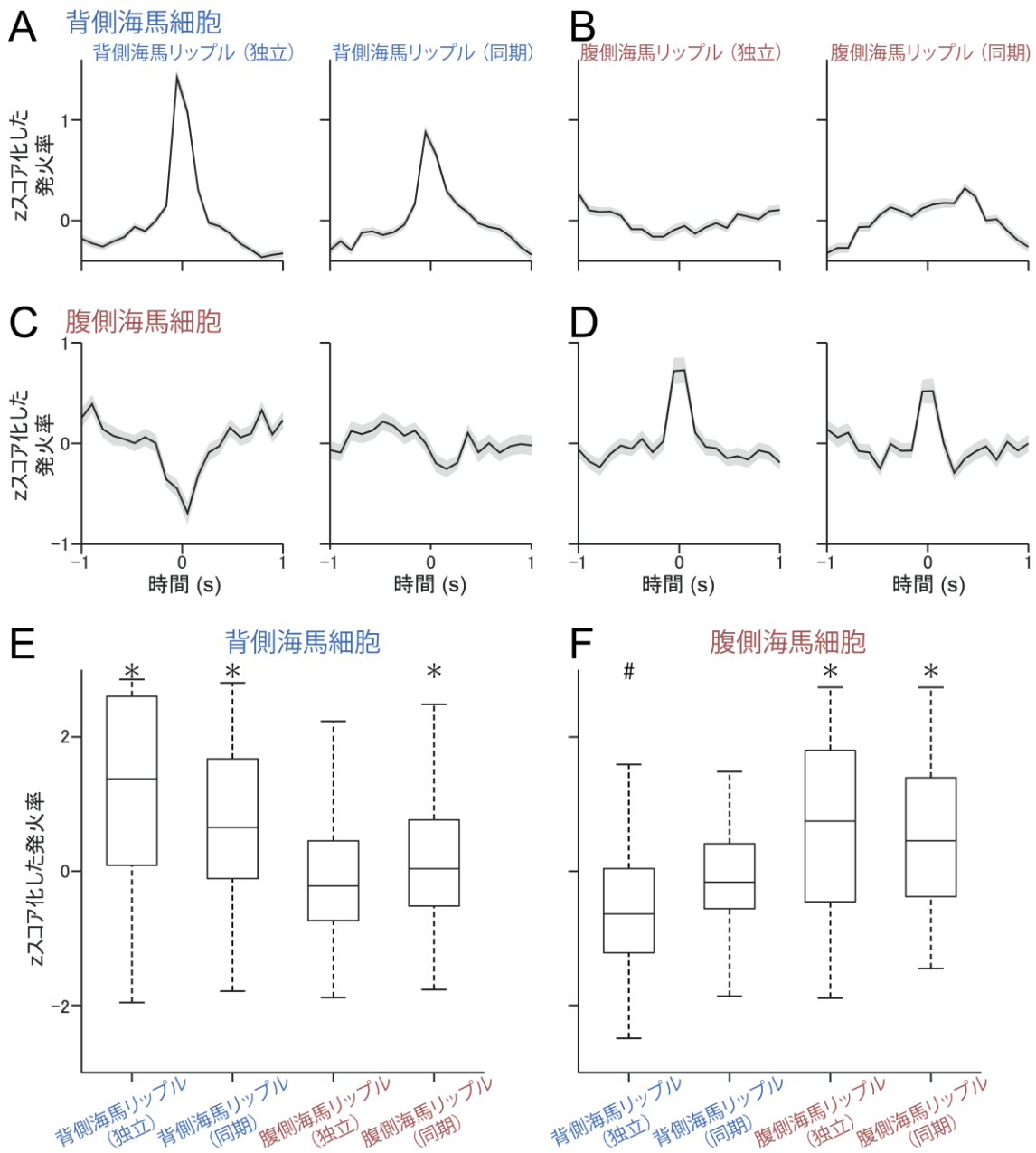


図 9 腹側海馬細胞は独立に生じる背側海馬リップル時に抑制される

A) (左)前後 500m 秒以内に腹側海馬でリップルが観察されなかった背側海馬リップルを独立リップルと定義し、背側海馬独立リップル発生時の背側海馬細胞集団の発火率について z スコア化して示した。(右)前後 500m 秒以内に腹側海馬でリッ

プルが観察された背側海馬リップルを同期リップルと定義し、背側海馬同期リップル発生時の背側海馬細胞集団の発火率について z スコア化して示した。

B) A と同様に腹側海馬リップル発生時の背側海馬細胞集団の発火率について z スコア化して示した。

C) A と同様に背側海馬リップル発生時の腹側海馬細胞集団の発火率について z スコア化して示した。

D) B と同様に腹側海馬リップル発生時の腹側海馬細胞集団の発火率について z スコア化して示した。

F) A - D で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を示した。背側海馬細胞は、背側海馬リップル及び腹側海馬同期リップルで有意に発火率を上昇させた。一方で腹側海馬細胞は、腹側海馬リップルで有意に発火率を上昇させたが、背側海馬独立リップルでは有意に発火率を低下させた。背側海馬細胞 背側独立リップル: $*p = 1.1 \times 10^{-59}$, 背側同期リップル: $*p = 5.3 \times 10^{-38}$, 腹側独立リップル: $p = 0.10$, 腹側同期リップル: $*p = 0.0013$, $n = 439$ cells; 腹側海馬細胞 背側独立リップル: $*p = 5.7 \times 10^{-9}$, 背側同期リップル: $p = 0.21$, 腹側独立リップル: $*p = 2.6 \times 10^{-8}$, 腹側同期リップル: $*p = 7.1 \times 10^{-6}$, $n = 152$ cells

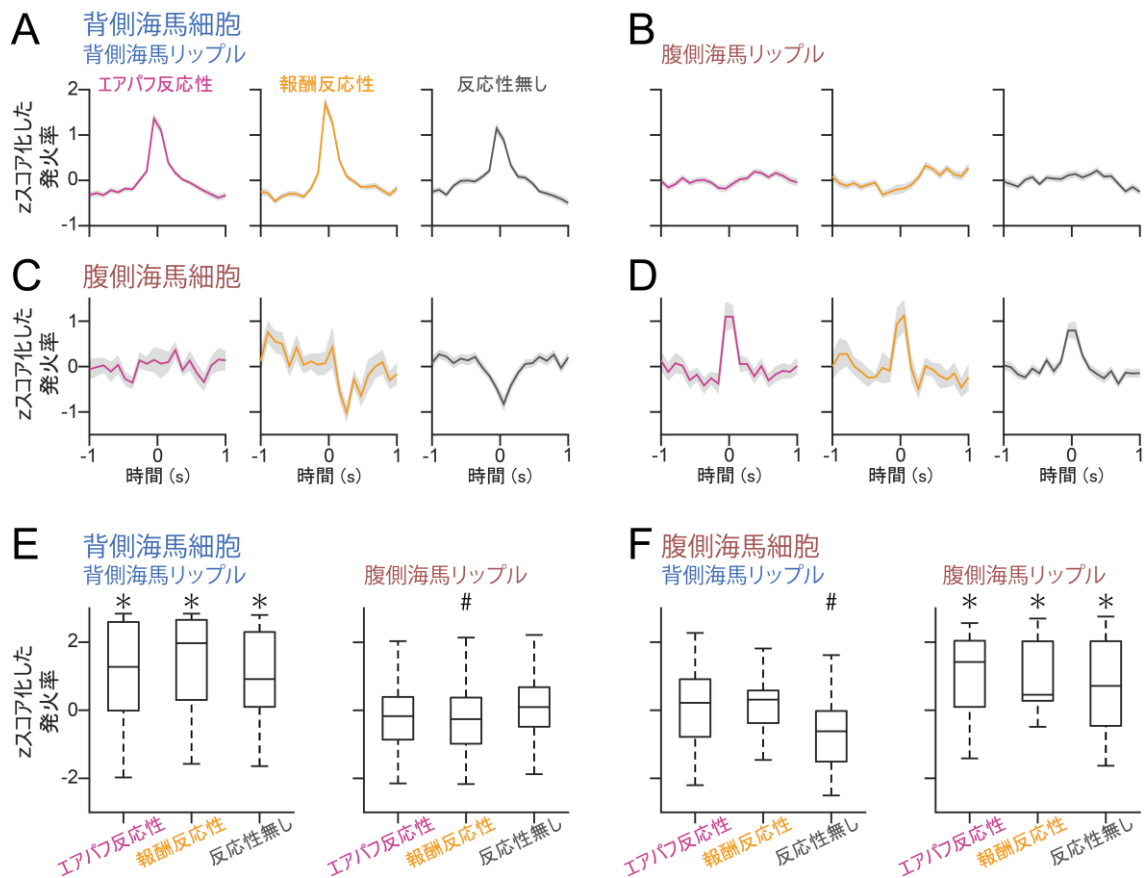


図 10 情動要素に反応性を持たない腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制される

- A) 背側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。(左) エアパフ反応性細胞、(中) 報酬反応性細胞、(右) 情動要素に反応性を持たない細胞。
- B) 腹側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。
- C) 背側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。

- D) 腹側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。
- E) A - B で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を示した。背側海馬の各情動要素反応性細胞は、背側海馬リップル時に発火率を上昇させた。一方で腹側海馬リップル時には報酬反応性細胞のみが有意に発火率を上昇させた。背側海馬リップル時 エアパフ反応性: $*p = 3.1 \times 10^{-25}$, $n = 176$ cells, 報酬反応性: $*p = 2.4 \times 10^{-25}$, $n = 131$ cells, 反応性無し: $*p = 2.6 \times 10^{-20}$, $n = 160$ cells, 腹側海馬リップル時 エアパフ反応性: $p = 0.069$, $n = 176$ cells, 報酬反応性: $*p = 0.035$, $n = 131$ cells, 反応性無し: $p = 0.074$, $n = 160$ cells
- F) C - D で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を示した。腹側海馬の各情動要素反応性細胞は、腹側海馬リップル時に発火率を上昇させた。一方で背側海馬リップル時には情動要素に反応性を持たない細胞のみが有意に発火率を低下させた。背側海馬リップル時 エアパフ反応性: $p = 0.72$, $n = 22$ cells, 報酬反応性: $p = 0.48$, $n = 13$ cells, 反応性無し: $*p = 2.4 \times 10^{-6}$, $n = 72$ cells, 腹側海馬リップル時 エアパフ反応性: $*p = 7.0 \times 10^{-4}$, $n = 22$ cells, 報酬反応性: $*p = 0.013$, $n = 13$ cells, 反応性無し: $*p = 6.7 \times 10^{-6}$, $n = 72$ cells

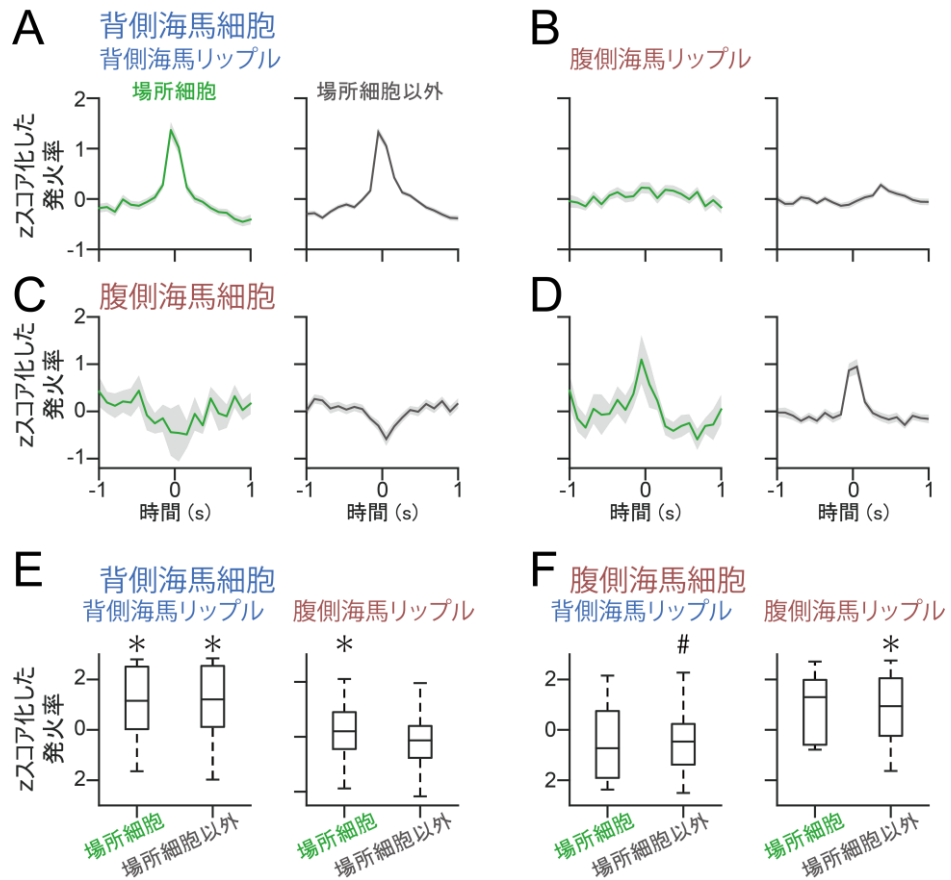


図 11 場所細胞以外の腹側海馬細胞が背側海馬リップル時に抑制される

- A) 背側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率。(左) 場所細胞、(右) 場所細胞以外。
- B) 腹側海馬リップル発生時の、背側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。
- C) 背側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。
- D) 腹側海馬リップル発生時の、腹側海馬細胞集団の z スコア化した発火率について A と同様に示した。

- E) A - B で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を示した。背側海馬の各細胞は、背側海馬リップル時に発火率を上昇させた。一方で腹側海馬リップル時には場所細胞のみが有意に発火率を上昇させた。背側海馬リップル時 場所細胞: $*p = 1.8 \times 10^{-14}$, $n = 102$ cells , 場所細胞以外: $*p = 3.6 \times 10^{-41}$, $n = 337$ cells, 腹側海馬リップル時 場所細胞: $*p = 0.048$, $n = 102$ cells , 場所細胞以外: $p = 0.18$, $n = 337$ cells
- F) C - D で算出された z スコア化した発火率のリップルピーク時の値を示した。腹側海馬の場所細胞以外の細胞は、腹側海馬リップル時に発火率を上昇させ、背側海馬リップル時には有意に発火率を低下させた。背側海馬リップル時 場所細胞: $p = 0.41$, $n = 18$ cells , 場所細胞以外: $#p = 3.0 \times 10^{-4}$, $n = 134$ cells, 腹側海馬リップル時 場所細胞: $p = 0.12$, $n = 18$ cells , 場所細胞以外: $*p = 3.3 \times 10^{-9}$, $n = 134$ cells

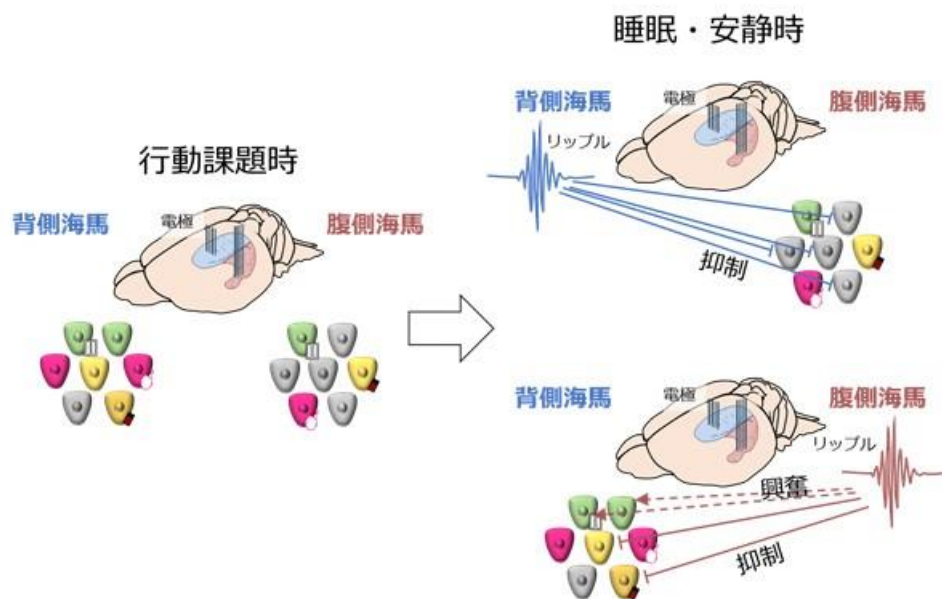
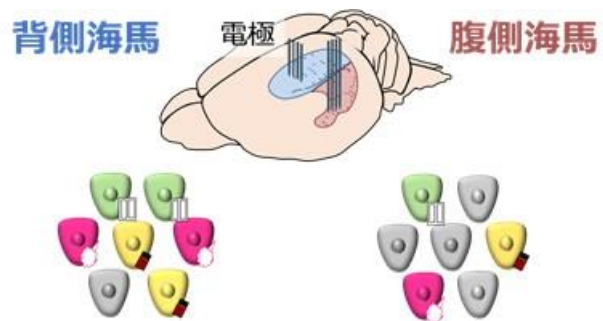


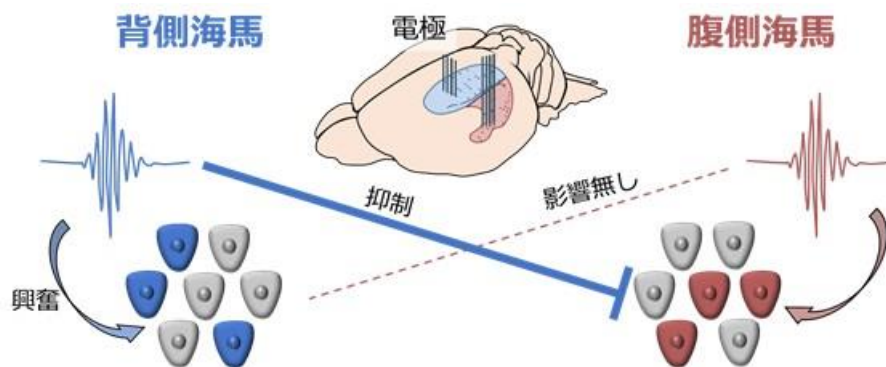
図 12 まとめ図

本研究で明らかとなった、背側・腹側海馬の活動のまとめ図。行動課題時には空間、情動要素に反応する細胞が背側・腹側海馬にそれぞれ存在し、その割合は背側海馬で高かった。睡眠・安静時には、背側海馬リップル時に腹側海馬の反応性を示さない細胞の活動が抑制された。一方で腹側海馬リップル時には、背側海馬の報酬反応性の細胞の活動は抑制されたが、場所細胞の発火率は上昇した。



補足図 1 行動時の神経活動のまとめ図

背側・腹側海馬の両方において場所細胞、情動要素に対する反応性を示す細胞が観察された。また、これらの細胞の割合は背側海馬でより高いことが明らかとなった。



補足図 2 睡眠安静時における背側・腹側海馬の細胞集団活動まとめ図

背側・腹側海馬の細胞集団は各領域内のリップル時に発火率が上昇すること、一方で互いのリップル時には発火率が上昇せず、特に背側海馬リップル時には腹側海馬神経集団の発火活動が抑制されることを明らかにした。

5. 考察

本研究では、新規手法の導入と、空間と情動に関わる要素を伴う行動試験系の構築を行い、本課題遂行中及びその後の背側・腹側海馬神経活動の記録を行った。そしてこれによって、空間、情動要素に関わる神経活動変化を起こす細胞の割合が共に背側海馬において多いことを明らかにした。さらに、行動課題後の睡眠・安静時にはリップルが一部独立に生じること、また、背側・腹側海馬リップル時にはそれぞれの細胞集団の発火活動が増加する一方で互いの発火活動は増加しないことを示した。また特に、腹側海馬細胞集団の発火活動は背側海馬リップル時には低下することを明らかにした。そして、この背側海馬リップル時に発火活動が低下する細胞は特に情動要素、場所に反応性を持たない細胞集団であることを見出した。以上の結果から、睡眠時には異なる情報を持つ腹側海馬細胞が、背側海馬神経から異なる制御を受けることが示唆された。

5-1. 空間依存的な発火活動を示す海馬神経細胞

本研究では、背側、腹側海馬の両方に場所細胞が存在すること、またその割合および場所細胞の空間情報量は共に背側海馬で高いことを示した。

一般に、背側海馬は空間の認識や学習に関わると考えられている。この理由の一つに、場所依存的な発火活動を示す場所細胞が背側海馬に存在する(O'Keefe and Dostrovsky, 1971)ことが挙げられる。一方で、腹側海馬においても場所細胞は存在するが、背側海馬に比べて腹側海馬やこれらの中間領域では場所受容野が広く、情報量が低いこと(Jung et al., 1994; Maurer et al., 2005; Kjelstrup et al., 2008)が示されている。

る。本研究で得られた結果はこれらの結果と矛盾しない。すなわち同じ個体内から同時に記録を行った場合にも、過去の知見と同様の結果が得られることが確認された。従って、本研究で用いた情動要素を含む行動課題においても、空間依存的な発火活動は背側、腹側海馬で異なること、また、背側海馬において個々の細胞についても細胞集団全体についても空間に関する情報を多く保持している可能性が示された。

5-2. 情動要素に対して反応性を示す海馬神経細胞の行動への影響

図 4 で示したように、本研究では行動課題中の情動要素に反応性を示す細胞が存在し、その細胞は特に背側海馬に多いことを示した。

本研究の結果は、従来の腹側海馬が情動行動に関与するという知見と反するよう
に思われる。これについて考察を行う。そもそも腹側海馬が情動に関わるとされてきた理由は、過去の知見において、腹側海馬の薬理学的な除去・操作や光遺伝学的手法を用いた活動操作によって情動行動が変化することが示されており (Bast et al., 2001; Kjelstrup et al, 2002; Britt et al., 2012; Flix-Ortiz et al., 2013; Padilla-Coreano et al., 2016; Parfitt et al., 2017)、このような変化は背側海馬の除去では生じない (Pentkowski et al., 2006; Riaz et al., 2017) ということがある。この原因として、背側・腹側海馬の神経細胞が持つ投射の違いがあると考えられる。背側海馬の細胞は嗅内皮質などに投射を持っている (Fanselow and Dong, 2010)。嗅内皮質は海馬同様に空間依存的に発火活動を示す細胞を持ち (Fyhn et al., 2004)、これらの領域間で空間情報をやり取りしていると考えられている。一方で腹側海馬神経が投射を持つ扁桃体や前頭前皮質、側坐核は嫌悪や報酬に関わる行動に重要であることが知られている。従って背側・腹側

海馬神経細胞の活動は異なる神経回路に影響を与えられ、また、腹側海馬の神経細胞は直接投射を情動行動に関わる脳領域へ送っているため、情動行動の変化を引き起こす力がより強いと推察できる。従って、本研究で観察された情動要素への反応性細胞の活動は背側・腹側海馬各領域で行動に与える影響が異なる可能性がある。

5-3. 情動要素に対して反応性を示す腹側海馬神経細胞集団

本研究では、報酬という正の情動に対する反応性細胞と、嫌悪刺激という負の情動に対する反応性細胞の両方が腹側海馬に存在することを示した。先述した様に腹側海馬は多数の脳領域に投射を送っていること(Cenquizca et al, 2007; Arszovski et al, 2014)が知られている。中でも不安という負の情動が生じるときには、前頭前皮質と腹側海馬のシータ波の同期度合いが高まることや(Adhikari et al., 2010)、腹側海馬のうち前頭前皮質に投射を持っている細胞に不安細胞が存在すること(Adhikari et al., 2011; Ciocchi et al., 2015)が知られている。一方で腹側海馬と扁桃体の活動は恐怖条件付けの成績に関わること(Xu et al., 2016)が知られており、また恐怖条件付け時には前頭前皮質、扁桃体の両方に投射する細胞が細胞の活動マーカーである c-fos の陽性割合が高いこと(Kim et al., 2017)も示されている。これらのことから、今回観察された嫌悪刺激反応性の細胞も、腹側海馬のうち特にこれら扁桃体・前頭前皮質の領域に投射を持つ細胞集団に多いことが考えられる。また報酬に対する反応性については側坐核、外側中隔との関係性が調べられている。側坐核への投射を持つ腹側海馬細胞の活動促進では、その際の行動が強化されることが示されている。また、腹側海馬

から外側中隔への投射の操作は摂食量や不安様行動を変化させることが知られている(Sweeney et al., 2015; Parfitt et al., 2017)。これらのことから、報酬反応性の細胞はこれらの領域に投射を持つ可能性が高いと推察できる。また、特に側坐核 shell への投射を持つ細胞は深層に多い傾向(Okuyama et al., 2016)や、カルビンジン陽性細胞が特に側坐核 shell に投射を持つこと(Arszovski et al., 2014)なども知られている。すなわち、各反応性の細胞は各神経細胞が持つ投射や遺伝的情報によってあらかじめ定まっている可能性が考えられる。

5-4. 情動要素に対して反応性を示す背側海馬神経細胞集団

背側海馬についても報酬に対して反応性を示す細胞が存在することはこれまでに数は少ないものの報告がある(Gauthier et al., 2018)。しかしながら、過去の知見で示された報酬反応細胞の割合と比較して本研究では高い割合の報酬反応性細胞が確認された。この原因に、本研究は情動要素に加えて様々な要素を含む行動試験を採用したことが考えられる。背側海馬では情動要素に加えて様々な要素に対して反応性を示す細胞が存在することが考えられる。例えば、背側海馬では重要な場所において高い活動を示す細胞や(Hollup et al., 2001; Dupret et al., 2010)、目印に対して活動を示す細胞(Gothard et al., 1996; Sato et al., 2020)が存在することが示されている。本研究では報酬、嫌悪刺激共にそれらが提示される場所には自動化のための機器が存在する。従ってこれらの機器を目印とし、あるいは報酬・嫌悪刺激といった情動変化を導く要素の重要性に対して反応を示す細胞についても同様に反応していることが考えられる。また、背側海馬細胞は場所に依存しない文脈(Aronov et al., 2017)や時間を表

象する細胞 (Pastalkova et al., 2008)、他個体を表象する細胞 (Danjo et al., 2018) など様々な要素に対して反応性を示す細胞が存在することが示されている。従って本研究で用いた行動課題のように多数の要素を含む課題では背側海馬細胞は反応性を示しやすい可能性が考えられる。さらに、背側海馬細胞のうち場所細胞である割合は一定ではなく、環境を拡大すると新たに場所細胞となる細胞が存在することが示されている (Rich et al., 2014)。情動要素に対する反応性の強度と反応性を示す細胞集団の関係性について同様に調べた知見は存在しないが、情動要素の強度によって反応性を持つ細胞の割合が変化する可能性も考えられる。

背側海馬に投射を送る脳領域の 1 つである嗅内皮質は、内側嗅内皮質と外側嗅内皮質に分けられる。これらの領域を比較すると、特に外側嗅内皮質の細胞の活動は空間情報量が低いことや、物に反応性を示しやすいことが知られている (Hargreaves et al., 2005; Deshmukh et al., 2011)。また、外側嗅内皮質から海馬へ投射を持つ細胞の一部は報酬などに反応すること (Basu et al., 2016) も明らかにされている。従って、外側嗅内皮質からの投射を受ける細胞に情動要素へ反応性を示す細胞が多い可能性が考えられる。外側嗅内皮質から海馬への投射は一様ではなく (Li et al., 2017)、また海馬においても深層の細胞がより場所ではなくものに反応しやすい (Geiller et al., 2017) あるいは報酬付近で場所受容野が安定的である (Danielson et al., 2016) ことを鑑みると、背側海馬内でも特定の細胞集団がより情動要素に反応性を持つ可能性が考えられる。

5-3. 背側・腹側海馬リップル発生時の神経活動

リップルは動物の睡眠・安静時に良く観られる、高周波帯域の局所場電位である。このリップルは背側海馬でも、腹側海馬でも生じることが知られている。本研究で、背側・腹側海馬のリップルは一部独立に生じること、また特に背側海馬リップル発生時には腹側海馬細胞集団の活動が抑制されることを明らかにした。過去の知見から、海馬 CA1 野の細胞は背腹軸方向にも投射を送っていること (Yang et al., 2014; Fredes et al., 2020) が知られている。特に、背側海馬 CA2 野の神経細胞は腹側海馬 CA1 野の一部の領域に存在する神経に抑制性細胞を介した抑制性入力を送っていることが明らかにされている (Meira et al., 2018)。本研究において観察された、腹側海馬神経活動の抑制は、このような抑制性の入力によって引き起こされていることが推察される。

特に図 9 で、背側海馬リップル時の腹側海馬神経活動の抑制は、特に独立に生じるリップル時に生じやすい事、逆に腹側海馬同期リップル時には背側海馬細胞集団は発火率が上昇することを明らかにした。すなわち、各領域リップル時の互いの神経活動の変化傾向は、独立リップルでより強く生じやすかった。このことから、リップルが同期して生じている際には、領域内リップルに伴う同じ領域の細胞集団の発火を活性化する入力と、領域外リップルに伴う発火を抑制する入力が同時に生じている可能性が考えられる。また、背側海馬細胞の発火は腹側海馬同期リップル時にも上昇することをふまえると、背側海馬リップルが発火活動変化に与える影響は腹側海馬リップルよりも強いことが推察される。

また本研究では特に情動要素に反応性を示さない腹側海馬細胞や場所細胞以外の細胞が背側海馬リップル時に抑制されやすいことを示した。先述したように、各刺激への反応性を示す細胞はあらかじめある程度定まった細胞集団に属する可能性が

ある。これをふまえると、上記抑制性の入力、特に情動要素に反応しない細胞集団により多く送られていることも考えられる。

また、このように特定の細胞集団の活動のみを抑制するという現象の意義として、背側海馬細胞集団が活動する際に、腹側海馬の特定の細胞の活動を残し、これらの情報の関係を強化している可能性が考えられる。ここまで背側海馬の細胞集団の活動、と一言で説明して来たが、実際のリップル時には毎回全ての細胞が活動するわけではなく、様々な集団の活動が見られる。特に直前の行動試験の一部の経路を示すような細胞の順序だった活動が観察されること (Wilson and McNaughton, 1994; Lee and Wilson, 2002; Diba and Buzsáki, 2007; Buzsáki, 2015) がこれまでに示されている。本研究の情動要素は行動課題内に存在しており、空間との関係の中で経験されているため、実際の学習や記憶の固定についてもこれとの関係と共に行われていることが推測できる。従って、特定の行動課題の経路を示す背側海馬細胞集団が活動する際に、それに関わる腹側海馬細胞が特異的に活動している可能性がある。また、本研究では記録細胞数の関係から報酬や嫌悪刺激に対して活動を上昇・抑制するものを一まとめとして解析を行っているが、これらの活動がリップル中にも再現されている可能性も考えられる。

6. 総括

本研究では、空間学習に情動要素を加えた行動課題を作成し、背側および腹側海馬の神経活動を同時に記録する手法を構築することで、以下の 6 点について明らかにした。

1. 背側、腹側海馬には、行動課題遂行中にエアパフおよび報酬の各情動要素に反応性を示す細胞が存在し、その割合は背側海馬で高い
2. 背側、腹側海馬には場所細胞が存在し、その割合は背側海馬で高い
3. 行動課題後の睡眠・安静時の背側・腹側海馬リップルは一部独立に生じる
4. 背側・腹側海馬細胞の発火率は各領域のリップル発生時に上昇する
5. 背側海馬リップル発生時には腹側海馬細胞の活動が抑制され、これは特に背側海馬のみで独立に生じるリップルで顕著である
6. 腹側海馬細胞のうち、情動要素および場所に反応性を持たない細胞が特に背側海馬リップル時に抑制される

以上のように、本研究の行動課題において情動要素および空間に反応性を示す細胞は共に背側・腹側海馬のいずれにおいても観察され、その割合は背側海馬で多いことを明らかとした。また、その後の睡眠中には、腹側海馬細胞集団の発火活動が背側海馬リップル発生時に抑制されることを示した。さらに、行動課題遂行中に各神経細胞が示す活動によって、睡眠安静時のリップル発生中に受ける制御が異なることを明らかにした。これらの結果は、海馬において記憶が固定される際には、背側・腹側

海馬内と互いの領域間で情報伝達が行われており、これらの領域間で直前の行動時に関わる特定の情報をやり取りしている可能性を示唆する。

本研究は、正・負の両方の情動要素に対する背側・腹側海馬の発火活動変化について、またその後の睡眠時の背側・腹側海馬神経活動の関係性について示した初めての知見であり、これまで異なる働きを担うと考えられ独立に調べられてきたこれらの領域の関係性について解明する一端となることが期待される。

7. 参考文献

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA. Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*. 2010;65(2):257-269. doi:10.1016/j.neuron.2009.12.002
- Aronov D, Nevers R, Tank DW. Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit. *Nature*. 2017;543(7647):719-722. doi:10.1038/nature21692
- Bast T, Zhang WN, Feldon J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABAA agonist muscimol. *Exp Brain Res*. 2001;139(1):39-52. doi:10.1007/s002210100746
- Basu J, Zaremba JD, Cheung SK, et al. Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science* (80-). 2016;351(6269). doi:10.1126/science.aaa5694
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A. Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron*. 2012;76(4):790-803. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.040
- Carr ME, Jadhav SP, Frank LM. Hippocampal replay in the awake state: A potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci*. 2011;14(2):147-153. doi:10.1038/nn.2732
- Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T. Supplementary Materials for Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. *Science* (80-). 2015;348(560). doi:10.1126/science.aaa3245
- Danielson NB, Zaremba JD, Kaifosh P, Bowler J, Ladow M, Losonczy A. Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1. *Neuron*. 2016;91(3):652-665. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.020
- Danjo T, Toyozumi T, Fujisawa S. Spatial representations of self and other in the hippocampus.

- Science (80-). 2018;359(6372):213-218. doi:10.1126/science.aao3898
- Deshmukh SS, Knierim JJ. Representation of Non-Spatial and Spatial Information in the Lateral Entorhinal Cortex. *Front Behav Neurosci.* 2011;5(October). doi:10.3389/fnbeh.2011.00069
- Diba K, Buzsáki G. Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nat Neurosci.* 2007;10(10):1241-1242. doi:10.1038/nn1961
- Dupret D, O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Csicsvari J. The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat Neurosci.* 2010;13(8):995-1002. doi:10.1038/nn.2599
- Ego-Stengel V, Wilson MA. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus.* 2010;20(1):1-10. doi:10.1002/hipo.20707
- Eschenko O, Ramadan W, Mölle M, Born J, Sara SJ. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem.* 2008;15(4):222-228. doi:10.1101/lm.726008
- Fanselow MS, Dong HW. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron.* 2010;65(1):7-19. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.031
- Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron.* 2013;79(4):658-664. doi:10.1016/j.neuron.2013.06.016
- Fernández-Ruiz A, Oliva A, de Oliveira EF, Rocha-Almeida F, Tingley D, Buzsáki G. Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory. *Science (80-).* 2019;364(6445):1082-1086. doi:10.1126/science.aax0758
- Fredes F, Silva MA, Koppensteiner P, Kobayashi K, Joesch M, Shigemoto R. Ventro-dorsal Hippocampal Pathway Gates Novelty-Induced Contextual Memory Formation. *Curr Biol.*

2020:1-14. doi:10.1016/j.cub.2020.09.074

Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* (80-). 2004;305(5688):1258-1264. doi:10.1126/science.1099901

Gauthier JL, Tank DW. A Dedicated Population for Reward Coding in the Hippocampus. *Neuron*. 2018;99(1):179-193.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.06.008

Geiller T, Fattahi M, Choi JS, Royer S. Place cells are more strongly tied to landmarks in deep than in superficial CA1. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms14531

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1222-1223. doi:10.1038/nn.2384

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1222-1223. doi:10.1038/nn.2384

Gothard KM, Skaggs WE, Moore KM, McNaughton BL. Binding of hippocampal CA1 neural activity to multiple reference frames in a landmark-based navigation task. *J Neurosci*. 1996;16(2):823-835. doi:10.1523/jneurosci.16-02-00823.1996

Hargreaves EL, Rao G, Lee I, Knierim JJ. Neuroscience: Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* (80-). 2005;308(5729):1792-1794. doi:10.1126/science.1110449

Ito HT, Zhang SJ, Witter MP, Moser EI, Moser MB. A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature*. 2015;522(7554):50-55. doi:10.1038/nature14396

Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, et al. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*. 2018;97(3):670-683.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.016

Joo HR, Frank LM. The hippocampal sharp wave–ripple in memory retrieval for immediate use

- and consolidation. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(12):744-757. doi:10.1038/s41583-018-0077-1
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci.* 1994;14(12):7347-7356.
- Kim W Bin, Cho J-H. Synaptic Targeting of Double-Projecting Ventral CA1 Hippocampal Neurons to the Medial Prefrontal Cortex and Basal Amygdala. *J Neurosci.* 2017;37(19):3579-16. doi:10.1523/JNEUROSCI.3579-16.2017
- Kjelstrup KB, Solstad T, Brun VH, et al. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science (80-).* 2008;321(5885):140-143. doi:10.1126/science.1157086
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10825-10830. doi:10.1073/pnas.152112399
- Li Y, Xu J, Liu Y, et al. A distinct entorhinal cortex to hippocampal CA1 direct circuit for olfactory associative learning. *Nat Neurosci.* 2017;20(4):559-570. doi:10.1038/nn.4517
- Maurer AP, VanRhoads SR, Sutherland GR, Lipa P, McNaughton BL. Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus.* 2005;15(7):841-852. doi:10.1002/hipo.20114
- Meira T, Leroy F, Buss EW, Oliva A, Park J, Siegelbaum SA. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-14. doi:10.1038/s41467-018-06501-w
- O'Keefe J, Dostrovsky J, J. O'Keefe JD. Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971;34(1):171-175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>.
- Okuyama T, Kitamura T, Roy DS, Itohara S, Tonegawa S. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science (80-).* 2016;353(6307):1536-1541. doi:10.1126/science.aaf7003

- Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*. 2016;89(4):857-866. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.011
- Papale AE, Zielinski MC, Frank LM, Jadhav SP, Redish AD. Interplay between Hippocampal Sharp-Wave-Ripple Events and Vicarious Trial and Error Behaviors in Decision Making. *Neuron*. 2016;92(5):975-982. doi:10.1016/j.neuron.2016.10.028
- Parfitt GM, Nguyen R, Bang JY, et al. Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviors in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(8):1715-1728. doi:10.1038/npp.2017.56
- Patel J, Schomburg EW, Berenyi A, Fujisawa S, Buzsaki G. Local Generation and Propagation of Ripples along the Septotemporal Axis of the Hippocampus. *J Neurosci*. 2013;33(43):17029-17041. doi:10.1523/JNEUROSCI.2036-13.2013
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci*. 2006;23(8):2185-2196. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04754.x
- Pothuizen HHJ, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: A within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*. 2004;19(3):705-712. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03170.x
- Shantanu P, Jadhav, Caleb Kemere, P. Walter German and LMF. Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory. *Science* (80-). 2012;336:1454–1458. doi:10.1126/science.1217230.Awake
- Riaz S, Schumacher A, Sivagurunathan S, Van Der Meer M, Ito R. Ventral, but not dorsal, hippocampus inactivation impairs reward memory expression and retrieval in contexts

- defined by proximal cues. *Hippocampus*. 2017;27(7):822-836. doi:10.1002/hipo.22734
- Rich PD, Liaw HP, Lee AK. Large environments reveal the statistical structure governing hippocampal representations. *Science* (80-). 2014;345(6198):814-817. doi:10.1126/science.1255635
- Sato M, Mizuta K, Islam T, et al. Distinct Mechanisms of Over-Representation of Landmarks and Rewards in the Hippocampus. *Cell Rep*. 2020;32(1):107864. doi:10.1016/j.celrep.2020.107864
- Sosa M, Joo HR, Frank LM. Dorsal and Ventral Hippocampal Sharp-Wave Ripples Activate Distinct Nucleus Accumbens Networks. *Neuron*. 2020;105(4):725-741.e8. doi:10.1016/j.neuron.2019.11.022
- Sweeney P, Yang Y. An excitatory ventral hippocampus to lateral septum circuit that suppresses feeding. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms10188
- Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. *Image Environ Cogn Mapp Spat Behav*. 2017;55(4):27-50. doi:10.4324/9780203789155-11
- Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H. Hippocampal Neurons Encode Information about Different Types of Memory Episodes Occurring in the Same Location. *Neuron*. 2000;27:623-633.
- Xu C, Krabbe S, Gründemann J, et al. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*. 2016;167(4):961-972.e16. doi:10.1016/j.cell.2016.09.051
- Yang S, Yang S, Moreira T, et al. Interlamellar CA1 network in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(35):12919-12924. doi:10.1073/pnas.1405468111
- McNaughton MAW and BL. Reactivation of Hippocampal Ensemble Memories During Sleep. *Science* (80-). 1994;265(July):5-8.
- Eva Pastalkova, Vladimir Itskov, Asohan Amarasingham and GB. Internally Generated Cell

- Assembly Sequences in the Rat Hippocampus. *Science* (80-). 2008;321:1322-1327.
doi:10.1126/science.1159775.Internally
- Lee AK, Wilson M a. Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*. 2002;36(6):1183-1194. doi:10.1016/S0896-6273(02)01096-6
- O'Keefe, John; Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Vol 27.; 1980.
doi:10.5840/philstudies19802725
- Forrest E, Morris RGM. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(October):9697-9701.
- Arszovszki A, Borhegyi Z, Klausberger T. Three axonal projection routes of individual pyramidal cells in the ventral CA1 hippocampus. *Front Neuroanat*. 2014;8(June):1-11.
doi:10.3389/fnana.2014.00053
- Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*. 2007;56(1):1-26.
doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.002

謝辞

本研究を行うにあたり、いつも親身にご指導・ご鞭撻いただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室教授の池谷裕二先生に、心より感謝致します。研究に対する鋭い御指摘・御助言を賜りました。また、いつも温かい励ましの言葉を掛けて下さり、研究生活を送る上で大きな支えでした。

研究室内でのセミナーをはじめとする議論の場において、研究に対する適切な御指摘・御助言を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室准教授の小山隆太先生、東京大学大学院薬学系研究科特任准教授の竹内春樹先生、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室助教の中嶋藍先生、松本信圭先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の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助教の佐々木拓哉先生に心よりお礼申し上げます。テーマの設定から日々の実験、研究発表など様々な面でいつも親身に相談に乗って下さいました。また、新たな手法の導入なども自由に取り組みせていただき多くの経験を積むことができました。先生とのディスカッションを通じて、研究に対する姿勢をはじめ沢山のことを学ぶことができました。

博士課程を同期として共に過ごし、切磋琢磨した東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の青木勇樹さん、安藤めぐみさん、高夢センさん、平木俊光さん、八

木佐一郎さん、紺野大地さんに深くお礼申し上げます。皆さんのおかげで楽しく充実した研究生生活を過ごすことができました。

同じ研究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、多くのご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の鹿野悠さん、鹿山将さん、井形秀吉さん、中山亮太さん、西村侑也さん、小此木闘也さん、三宅功朔さん、柳下晴也さん、瀧口龍之介さんに心よりお礼申し上げます。

研究生生活を送る中で、あたた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の先輩、後輩の皆様に心より感謝致します。

最後になりましたが研究生生活においても、私生活においても私をサポートしてくださいました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させていただきます。