

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0072

研究課題名(和文)概日時計を創る：1細胞計測と操作による細胞ネットワークの再構築

研究課題名(英文)Single Cell Imaging and Manipulation in Master Circadian Clock

研究代表者

榎木 亮介 (Enoki, Ryosuke)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：00528341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日リズム中枢である視交叉上核は、約2万個の神経細胞とそれを取り巻くグリア細胞から構成される。本研究では、微小区画が多数配置されたパターン基盤を作成し、視交叉上核の神経細胞およびグリア細胞をパターン基盤上に分散培養し、細胞内カルシウムイオンの長期計測を行った。他の神経細胞やグリア細胞と一切物理的接触を持たない単一神経細胞では、記録を行ったほぼ全てで安定した概日リズムを観察した。一方でグリア細胞と接触を持つ単一神経細胞においては、概日リズムを示す細胞の割合が大幅に減少していた。このことは、神経細胞はグリア細胞から入力を受けて概日リズムを不安定化させることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視交叉上核は組織全体としては強靱なリズムを示す一方で、個々の神経細胞に分離するとリズム周期は不安定となることが報告されている。このことから、神経細胞はネットワークを形成して互いに連絡することで組織全体として安定したリズムを作り出すと想定されている。しかしながら従来の研究手法では、単一の神経細胞のみの機能を計測することは困難であり、神経細胞間の相互作用やグリア細胞との相互作用を区別して調べることは難しかった。本研究により開発した1細胞計測法により、他の細胞からの影響を制御した条件下で、単一神経細胞のみの概日リズム特性を計測することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is the center of the circadian clock in mammals. The SCN is composed of ca. 20,000 neurons and surrounding glial cells. In this study, we developed a microisland dish using MEMS technology, cultured neurons and glial cells, and performed the long-time calcium imaging from solitary single neuron.

We found that most of a solitary neuron (without any physical interaction with other neurons and glial cells) were rhythmic. In contrast, only one-third of a single neuron with glial cells are rhythmic. These results indicate that solitary SCN neurons receive a signal from glial cells and destabilize the circadian rhythms.

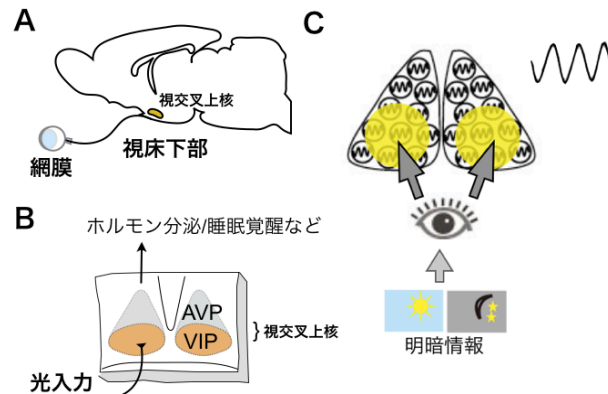
研究分野：神経生理学

キーワード：概日リズム 光イメージング MEMS カルシウム 神経細胞 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

現代社会では、ヒトは様々な非生物学的な環境に24時間絶えず晒されており、急激な光環境の変化や夜間の強い光照射などは、概日リズムの破綻を引き起こし、うつ病や癌の罹患率の上昇など様々な体と心の変調に至る。したがって、概日リズム発振機構の全容を解明することは、現代社会において最優先で取り組むべき課題の一つである。

哺乳類の概日リズムの中核は脳深く、視床下部に存在する視交叉上核に存在し、約2万個のヘテロな特性を持つ神経細胞(時計細胞)が機能的なネットワークを形成している。視交叉上核は網膜から直接の光環境情報を受け、全身にリズム情報を発振して、睡眠・覚醒などの約24時間の生理機能や動物行動を調節している(右図)。視交叉上核は部位特異的な「領域振動体」を形成し、複数の領域振動体同士が相互作用する「階層構造」を持ち、組織全体としては24時間に正確でロバスト(強靱)なリズムを示す。一方で、分散培養した個々の時計細胞は周期が不安定でばらつくことから、組織としての安定性やロバストさは、時計細胞の相互作用(シナプス結合や液性因子)により生み出されると考えられる。しかしながら従来の研究手法では、単一の神経細胞のみの機能を計測することは困難であり、神経細胞間の相互作用やグリア細胞との相互作用を区別して調べることは難しかった。



概日リズムの中核：視交叉上核

近年の分子生物学の発達により、1990年代後半の時計遺伝子の発見に端を発し、概日リズムの1細胞レベルでの分子メカニズムの理解が急速に深まっている。また数理モデルによるリズム研究により、視交叉上核のリズム発振は、細胞が集合して相互作用することで、リズム周期が安定化することが予測されている。しかしながら、分子レベルの還元的アプローチや数理モデル構築のみでは解決できない未解決な問題が山積しており、例えば「ヘテロな特性を持つ細胞ネットワークが何故生物学的に有利となりうるのか」という問いに対しては、数理モデルは未だ明確な答えを打ち出していない。こうした問題は、ネットワークを構成する細胞間の相互作用に起因すると推測されており、次なる生物時計の全容解明へのブレイクスルーの為には、単一細胞レベルで計測し、さらに細胞を操作して細胞ネットワークを作り上げる構成的アプローチが極めて有効であり、それを支える革新的技術基盤を構築することが必要である。

2. 研究の目的

分散培養した視交叉上核の神経細胞は、リズムの周期や振幅が不安定でばらつくことと報告されていることから、神経細胞間の相互作用により、組織全体として安定したリズムを発振すると考えられている。しかしながら、単独の神経細胞が本当に不安定なリズムを刻むかについては、1個の神経細胞のみを培養して長期計測することが実験的に困難であるため、未だ確証は得られていない。本研究による1細胞レベルでの長期培養と光計測によるアプローチにより、これまで未解決であった細胞間相互作用に起因する未解決問題に解をえることが出来れば、学術的な意義は大きいと考えた。特に本研究により、これまで技術的に困難であった「真の1細胞」での概日リズム計測が可能となり、今後研究をさらに発展させることで、概日リズム中枢ネットワークでのリズム発振機構の核心に迫ることができる。

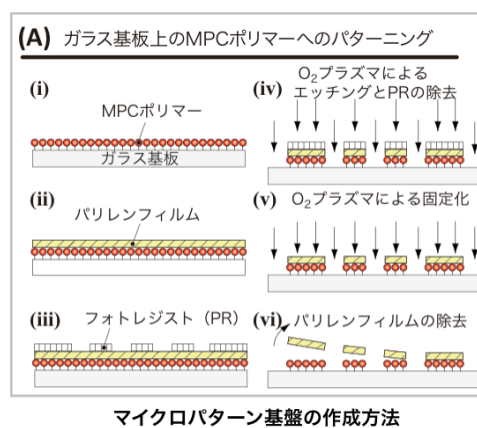
特に本研究提案では、Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) を利用した微細加工技術を用いて、培養する細胞数を厳密に制御できるマイクロパターン基板を作製し、視交叉上核の神経細胞を1細胞のみで培養し、長期光イメージング計測により概日リズム特性を観察することを目的に研究を行った。細胞内カルシウム濃度の変化を指標に、視交叉上核の単独の神経細胞での概日リズムを計測し、免疫染色や1細胞レベルの網羅的遺伝子発現の解析により細胞を同定してリズム特性を詳細に解析することで、自律振動および減衰振動する細胞の特性を解析し、真の概日リズム中枢を担う主時計を同定することを目指した。

3. 研究の方法

微細加工技術により、MPCポリマーとパリレンの皮膜が形成されたガラス基板を作成し、直径100μmの微小チャンバーが約900個配置された培養ディッシュを作成した。マウス脳より視交叉上核から摘出し、神経細胞およびグリア細胞を微小チャンバー内に培養した。続いてアデノ随伴ウイルスの感染により神経細胞特異的に蛍光カルシウムプローブ(GCaMP6s)を発現させ、高感度CCDカメラ、ニポウディスク共焦点ユニット、自動焦点補償機能付き顕微鏡などからなるタイムラプスシステムにより数日間の長期計測を行なった。光測定後に免疫染色により神経

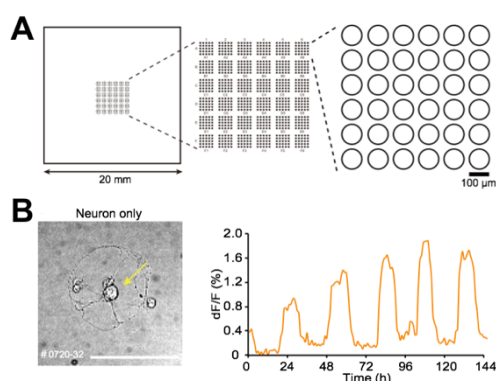
細胞の種類とグリア細胞の個数や位置を同定した。

マイクロパターン基盤の作成法を右図に示す。ガラス基板に細胞非接着因子：MPCポリマー被膜を形成し (A-i)、その上にパリレンを塗布する (A-ii)。フォトリソグラフィーにより、フォトレジスト (PR) をパターンし (A-iii)、パリレンと MPC ポリマーをエッチングしガラス表面を露出させ (A-iv)、マイクロサイズの溝を作製する (A-v)。パターン化されたガラス表面のみに細胞接着因子フィブロネクチンをコートし、パリレンを剥離する (A-vi)。この工程により、フィブロネクチンでコートされたガラス部分にのみ選択的に細胞を培養することが可能である。本研究では、直径 100 μ m の微小チャンバーが 900 個配置された培養ディッシュを作成し、細胞を培養した。



4. 研究成果

微小チャンバー内で視交叉上核由来の神経細胞を単独で培養できることを確認した。また単一神経細胞と複数のグリア細胞が共存している微小チャンバーの存在を確認した。続いて、長期タイムラプス計測により観察を行なったところ、他の神経細胞やグリア細胞と一切物理的接触を持たない単一神経細胞において、記録を行ったほぼ全ての神経細胞で安定した概日リズムを観察した (右図)。一方、グリア細胞と接触を持つ単一神経細胞においては、概日リズムを示す細胞の割合が大幅に減少していた。このことは、従来の定説とは異なり、視交叉上核の神経細胞は単独でも安定した概日リズムを示し、グリア細胞は神経細胞の概日リズムを抑制し不安定化させることを示している。



マイクロパターン基盤上に培養した単一神経細胞からの概日リズムの計測

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Ultradian calcium rhythms in the paraventricular nucleus and subparaventricular zone in the hypothalamus. Wu Y, Enoki R, Oda Y, Huang ZL, Honma KI, Honma S. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018 E9469-E9478. DOI: 10.1073/pnas.1804300115 (Enoki is co-first and corresponding author) [査読有]

② Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. Enoki R, Oda Y, Mieda M, Ono D, Honma S, Honma KI. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017 114 (12) E2476-E2485. DOI: <http://10.1073/pnas.1616815114> (Enoki is corresponding author) [査読有]

③ Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Enoki R, Ono D, Kuroda S, Honma S, Honma KI. Scientific reports (7) 41733 2017. DOI: 10.1038/srep41733 (Enoki is corresponding author) [査読有]

[学会発表] (計 38 件)

① Optical imaging of circadian calcium rhythm in a solitary suprachiasmatic neuron Y. Hirata, R. Enoki, K. Kuribayashi-Shigetomi, Y. Oda, S. Honma, K. Honma. 第 9 回アジア・オセアニア生理学会連合 2019 年大会 (FAOPS2019) (神戸), 2019 年 3 月 29 日

② 時を刻む脳 ～生物時計中枢を司る神経回路の光イメージング解析～, 榎木亮介, 生理学研究所、所長招聘セミナー (岡崎市、愛知県) 2019 年 2 月 4 日

③ 時を刻む脳 ～生物時計中枢における 神経回路の光イメージング解析～, 榎木亮介, 生理学学会北海道地方会総会 (北海道大学、札幌) 2018 年 12 月 7 日

④ マイクロパターン基板を用いた視交叉上核単一ニューロンの概日振動解析, 平田快洋, 榎木亮介, 繁富 (栗林) 香織, 織田義晃, 本間さと、本間研一. 化学とマイクロ・ナノシステム学

会第 38 回研究会 CHEMINAS 38th (札幌市民交流プラザ、札幌) 2018 年 10 月 30 日

⑤ Illuminating neuronal circuits governing circadian and ultradian rhythms in mammals, R. Enoki, The Fourth National Academic Conference of Sleep, Chronobiology and Neuropsychopharmacology (上海, 中国) 2017 年 12 月 16 日

⑥ 概日リズム中枢の神経細胞は 単独でリズムを刻むか? ~ナノテクノロジーと長期光計測によるアプローチ~, 榎木亮介, ニューロフォトニクス研究会 (北海道大学) 2017 年 10 月 27 日

⑦ マイクロパターン基板を用いた視交叉上核単一ニューロンの長期カルシウム蛍光イメージング, 平田快洋, 繁富 (栗林) 香織, 本間研一, 本間さと, 榎木亮介. バイオフロンティア講演会、北海道大学、札幌 2016 年 10 月 22 日

[図書] (計 2 件)

① Enoki R, Oda Y, Honma S, Honma KI. Imaging Circadian Voltage Rhythm in the Suprachiasmatic Nucleus. Sapporo Symposium Proceedings (edited by Honma K and Honma S), Hokkaido University Press. 2017; 177-186.

② Honma S, Ono D, Enoki R, Yoshikawa T, Kuroda S and Honma K. Oscillator networks in the suprachiasmatic nucleus: analysis of circadian parameters using time-laps images. Biological Clocks - 30th Anniversary of Sapporo Symposium on Biological Rhythm, (eds by Honma K and Honma S), Hokkaido University Press, Sapporo. 2016; 33-41.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.enokiryosuke.com>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 繁富 (栗林) 香織

ローマ字氏名: Kaori Kuribayashi-Shigetomi

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 高等教育推進機構

職名: 特任准教授

研究者番号 (8 桁): 90431816

研究分担者氏名: 平田 快洋 (平成 28 年 4 月 1 日以降、研究協力者)

ローマ字氏名: Yoshihiro Hirata

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 医学研究院

職名: 学術研究員

研究者番号 (8 桁): 90399824

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。