

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01831

研究課題名(和文)概日リズム安定化機構に関わるニューロン-グリア細胞間相互作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of neuron-glia interaction related to circadian rhythm generation using the calcium imaging of single suprachiasmatic neuron

研究代表者

平田 快洋(Hirata, Yoshihiro)

北海道大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：90399824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類における生物時計の中核である視交叉上核の概日リズムは、約2万個の神経細胞とそれらを取り囲むグリア細胞からなる。しかしながら、単一神経細胞とグリア細胞による概日リズム安定化のメカニズムの多くは不明である。本研究では、単一神経細胞のみの区画や単一神経細胞とグリア細胞の共培養状態の区画を形成し同時にイメージングすることで、神経細胞単独での概日リズムと神経細胞とグリア細胞が共存する状態での概日リズムを可視化解析した。その結果、単一神経細胞のみで極めて安定したリズム発振をすることだけでなく、単一神経細胞とグリア細胞が共存している状態では、概日リズム発振が異なる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In mammals, a master circadian clock is located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) which is composed of multiple circadian oscillator neurons and glial cells. Recent studies suggest that the SCN neurons are heterogeneous in not only cytochemical but also oscillatory properties. However, the mechanisms of circadian rhythm stabilization by single neuron cells and glial cells are unknown. In the present study, I examined circadian properties of a solitary SCN neuron using fluorescent time-lapse imaging and dissociated culture of isolate SCN neurons on spatially isolated microislands. I succeeded to record the circadian intracellular calcium rhythm in a solitary neuron on a microisland. Furthermore, I demonstrated that the circadian calcium rhythm of a solitary neuron coexisting with glial cells on a microisland was disturbed. These results indicate that circadian rhythms in solitary SCN neurons are cell-autonomous, which are destabilized and noise-induced by glial cells.

研究分野：神経科学

キーワード：視交叉上核 単一神経細胞 グリア細胞 カルシウムイメージング 概日リズム MEMS

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生物時計(概日リズム)の中核である視床下部視交叉上核は、両側でおよそ2万個の神経細胞とそれを取り巻くグリア細胞(アストロサイト)から構成される。個々のニューロンは同期的発火活動を行い、約24時間周期のリズムを脳内全領域および全身の生理機能に出力している。近年の分子生物学における技術革新によって、神経細胞内では、複数の時計遺伝子の転写と翻訳産物による転写抑制のループ機構が概日リズムの基盤となっていることが示されてきた。また、視交叉上核神経細胞群は組織としては強靱な同期的活動を示す一方で、個々の神経細胞に分離すると不安定でばらつきのある性質を示す。このことから、強靱な同期的活動と概日リズムは少なくとも神経細胞間相互作用(神経回路網や液性因子)によって作られており、体温変動や各種ストレスに対しても安定したリズムを刻むだけでなく、季節により異なる日長変化など多様な環境の周期性にも広く適応すると考えられている。さらに、神経細胞だけでなく、それらを取り巻くグリア細胞の機能にも近年注目が集まっている。しかしながら、これまでの研究手法では、単一の神経細胞に起因する機能や、神経細胞間の相互作用や神経細胞-グリア細胞間相互作用によって特徴的となる機能を分離して調べることは難しく、視交叉上核のリズム発振機能についても未解決の問題が山積していた。そのため、神経細胞のみや神経細胞とグリア細胞の機能を最小単位から還元的に解明することが必要であった。

2. 研究の目的

哺乳類における生物時計の中核は視床下部の視交叉上核に存在する。視交叉上核は両側で約2万個の神経細胞からなり、単独では不安定でばらつきのある神経細胞が機能的なネットワークを構成し、それらが階層的な発振構造体を形成することで24時間の安定したリズム

を全身へ送り、様々な生理機能を制御・調節している。さらに、視交叉上核には神経細胞数の3分の1程度のグリア細胞も存在しているが、視交叉上核の単一神経細胞のリズム発振に対する影響や概日リズム安定化への寄与など未解決の問題が山積している。

そこで本研究では、グリア細胞の概日性活動に注目し、哺乳類の生物時計の中核であるSCNの中核時計安定化機構に関わる概日性ニューロン-グリア細胞間相互作用を解明することを目的として研究を行なった。特に、細胞内の機能分子であるカルシウムイオンを可視化できる高感度カルシウムプローブと長期蛍光タイムラプス計測法、および、単一神経細胞とグリア細胞を微小区画内に隔離培養する方法を組み合わせることで、リズム発振の機能単位である単一神経細胞に対するグリア細胞の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

微小区画培養ディッシュは、微細加工技術(MEMS)を用いてカバーガラス上にプリントし、穴あき35mm培養ペトリディッシュに裏面より貼り付けることで作成した。ついで、野生型の新生マウスより視交叉上核を摘出し、微小区画が多数配置された培養皿上に分散培養を行い、翌日にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて高感度カルシウムプローブ(GCaMP6s)を、神経細胞特異的、あるいはグリア細胞特異的に発現させた。蛍光シグナルは、ニポウディスク式共焦点倒立顕微鏡に設置された高感度CCDカメラにより検出した。検出したシグナル変化は画像データとして保存し、ImageJやMatlabを用いてオフラインでリズムの有無、周期、位相などを解析した。

4. 研究成果

(1) グリア細胞内の概日カルシウム変動

グリア細胞内にカルシウム変動を計測するために、初代培養を行なったグリア細胞

に特異的に発現する高感度カルシウムプローブをアデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入した。グリア細胞内におけるダイナミックなカルシウムの変動を長期に渡って測定することに成功した。グリア細胞内では、局所的なカルシウム上昇や細胞内全体を伝搬するカルシウムウェーブが見られた。一方で、培養グリア細胞は微小区画内で形態を大きく変えながら動き回るため、細胞内のカルシウムイオン変動が概日性に変動しているか否かについて結論を導き出すことは出来なかった。

(2) 単一神経細胞の概日カルシウム変動

新生マウスより摘出した視交叉上核を微小区画培養ディッシュ上で分散培養することで、単一神経細胞のみ、あるいは、視交叉上核由来のグリア細胞と単一神経細胞が共存した状態で培養することが可能となった。また、単一神経細胞内にカルシウム変動を計測するために、神経細胞に特異的に発現する高感度カルシウムプローブをアデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入した。本実験では、視交叉上核の単一神経細胞が他の神経細胞やグリア細胞と物理的接触（シナプスやギャップジャンクション）を持たない培養状態（図1）で、ほぼ全ての細胞において極めて安定した細胞内カルシウムの変動を示す事を世界で初めて明らかとした。また、時計遺伝子発現で見られるサイン波状の変動と異なり、カルシウムシグナルはスパイク状あるいは矩形状の波形を示しており、細胞

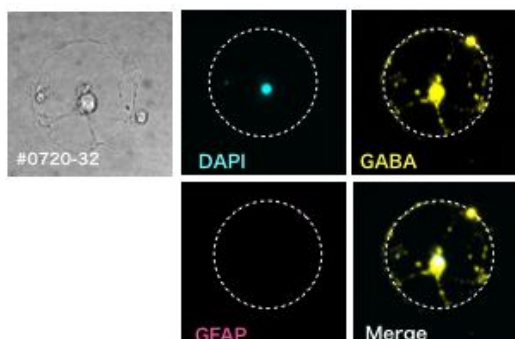


図1. 視交叉上核の単一ニューロン

内のカルシウム変動のオン・オフが何らかのメカニズムで制御されていることが示唆された。これらの結果については、現在論文投稿準備中である。

(3) 単一神経細胞-グリア細胞間相互作用

脳内においては、神経細胞はグリア細胞に囲まれており、何らかの神経細胞-グリア細胞間の相互作用が推測される。海馬などの脳内の他の領域では、グリア細胞が神経細胞の活動を修飾・制御していることが明らかとなっていることから、視交叉上核の神経細胞が担う概日リズム発振機構にグリア細胞が寄与しているとの仮説のもと、微小区画培養ディッシュ上で単純化された系を用いて検証を行なった。実験(2)について、グリア細胞と共存している単一神経細胞の概日リズム様式を記録、解析した。その結果、グリア細胞が共培養された状態にある微小区画内の単一神経細胞の半数以上で概日リズムそのものが見られなくなり、単一神経細胞単独の状態と異なって不安定になることが観察された(図2)。グリア細胞から放出されるグルタミン酸が、視交叉上核神経細胞のリズム制御に関わっているという最近の知見から、グルタミン酸受容体のブロッカーを投与し単一神経細胞の概日リズムを比較解析したが、投与前後で概日リズムに変化は見られな

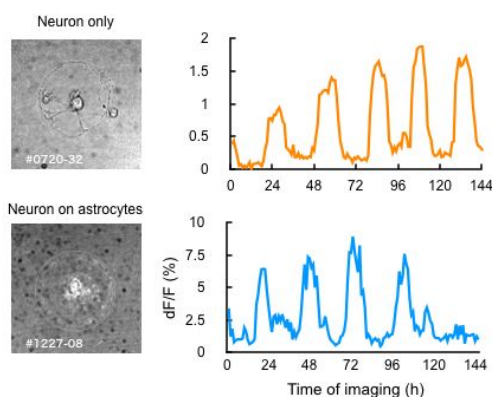


図2. 単一神経細胞のみ(上)およびグリア細胞と共存している単一神経細胞の概日リズム(下)

かった。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

1. 平田快洋, 榎木亮介, 繁富香織, 織田善昭, 本間さと, 本間研一. マウス視交叉上核の単一神経細胞における概日性Ca²⁺振動と神経-グリア間相互作用. 第24回日本時間生物学会学術大会, 京都大学, 2017年10月28-29日.
2. Hirata Y., Kuribayashi-Shigetomi K., Enoki R, Honma S., Honma K. Optical imaging of a single suprachiasmatic neuron using microisland culture. Sapporo Symposium on Biological Rhythm. 北海道大学, 2016年11月10日
3. 平田快洋, 繁富香織, 本間研一, 本間さと, 榎木亮介. 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カルシウム蛍光イメージング. 日本機械学会 第27回バイオフィロンティア講演会, 北海道大学工学部フロンティア応用科学研究棟, 2016年10月22-23日
4. 平田快洋, 本間さと, 本間研一. Circadian properties of a solitary single suprachiasmatic nucleus neuron in mice. 第93回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 2016年3月22-24
5. 平田快洋. 「視交叉上核単一ニューロンの概日特性とリズム安定化機構の解明」時間医学講座開講10周年記念シンポジウム, 北海道大学医学部, 2016年3月19日
6. 平田快洋. 「視交叉上核単一ニューロンの概日特性とリズム安定化機構の解明」脳神経機能学のフロンティア, 東京薬科大学, 2016年3月12日

7. 平田快洋, 繁富香織, 榎木亮介, 本間研一, 本間さと. 哺乳類の中枢時計の再構築と構成的理解を目指した基盤技術の開発. 第22回日本時間生物学会学術大会, 東京大学, 2015年11月21-22日.
8. 平田快洋. 「哺乳類中枢時計の再構築と構成的理解を目指した基盤技術の開発」, 第1回北海道ナノバイオ研究会 (HNB)シンポジウム, 北海道大学, 2015年8月18日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 快洋 (HIRATA, Yoshihiro)
北海道大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号: 90399824