

隔離した1神経細胞の概日リズム測定にはじめて成功

～概日リズム中枢の神経ネットワーク解明に大きく前進～

ポイント

- ・ほ乳類の概日リズム中枢を司る脳領域の単一神経細胞を物理的に隔離して計測することに成功。
- ・神経細胞は1個でも安定した概日リズムを刻み、グリア細胞は神経細胞のリズムを乱すことを発見。
- ・本研究は概日リズムのメカニズムの全容解明や薬剤開発のための高速な評価法への応用に期待。

概要

北海道大学の本間研一名誉教授、北海道大学脳科学研究教育センターの本間さと客員教授、同電子科学研究所の榎木亮介准教授（当時）（現：大学共同利用機関法人自然科学研究機構生命創成探究センター）らの研究グループは、哺乳類の単一の神経細胞を物理的に隔離して長期間培養し、リズムを可視化する手法を確立し、概日（がいじつ）リズム^{*1}の中枢領域である視交叉上核（しこうさじょうかく）^{*2}の神経細胞は1個のみでも安定した概日リズムを刻むこと、また、脳組織を構成するグリア細胞^{*3}が神経細胞の概日リズムを不安定化させることを発見しました。

ほ乳類の概日リズムは視床下部（ししょうかぶ）の視交叉上核に存在する神経細胞により制御されており、近年そのリズムを生み出す詳細な分子機構や細胞メカニズムについての理解が進んでいます。一方で、概日リズムは不安定な振動を示す神経細胞に由来するとの説もあり、研究者の間で長く議論されてきました。しかしながら、1個の神経細胞のみを隔離して計測することが実験的に難しく結論が得られていませんでした。

これまで本研究グループは、視交叉上核の神経細胞の働きを時計遺伝子^{*4}の発現や細胞内カルシウムを指標として長期間可視化する研究を行ってきました。今回、新たに半導体作製などで使用される微細加工技術^{*5}によるマイクロパターニング手法などを用いて、視交叉上核の神経細胞を一個ずつ物理的に隔離して培養することで、シナプス結合など他の神経細胞と一切接触をもたない単一神経細胞から、時計遺伝子の発現や細胞内カルシウム濃度変動を可視化することに成功しました。その結果、大多数の神経細胞は明瞭で安定した概日リズムを示すことがわかり、また神経細胞が刻む概日リズムはグリア細胞と共存することにより抑制されることが明らかとなりました。

今回の研究成果は、長らく議論されてきた問題に終止符を打つだけでなく、細胞やネットワークレベルでの概日リズム生成の基本メカニズムの全容解明に寄与するものです。さらに新たに開発した計測法は、概日リズムを調節する薬剤の高速評価系への応用など創薬にも寄与することが期待されます。

なお本研究成果は、2019年12月4日（水）公開のScientific Reports誌にオンライン掲載されました。

【背景】

哺乳類の約 24 時間のリズムを刻む仕組みである概日リズムの中核は、脳深部に位置する視床下部領域の視交叉上核に存在しています。視交叉上核はおよそ 2 万個の神経細胞から構成され、目からの直接の神経投射をうけて視交叉上核の固有の周期を 24 時間に調節し、全身の細胞や臓器に統一のとれたリズム情報として出力しています。現代社会において、極端な夜型生活、慢性的な睡眠不足、交代勤務により生物時計が乱れることは、うつ病や高血糖、高血圧などのリスク要因となり、心や体の変調をきたしてしまうことも知られています。

これまでの研究では、視交叉上核はネットワークを形成して互いに強固に連絡しあうことで安定した概日リズムを刻むこと、また他の神経細胞と弱い連絡しかもたない条件では多くの神経細胞でリズムが消失することが報告されていました。このことから、視交叉上核が安定した概日リズムを生み出すためには、神経細胞同士が連絡しあうことが重要であると考えられてきました。しかしながら、他の細胞と一切物理的な接触をもたない 1 個の神経細胞を培養して測定することは技術的に難しく、単一の神経細胞が示すリズムの性質については研究者の間で統一した見解は得られていませんでした。

【研究手法】

本研究グループはこれまで、概日リズム観察のための長期間の光イメージング計測法を確立し、視交叉上核の神経細胞ネットワークの働きを観察してきました。今回の研究では、1 個の神経細胞のみを物理的に隔離して培養できる培養皿を作成しました (図1a-b)。視交叉上核の 1 個の神経細胞を培養し (図1c)、高感度カメラ、恒温培養装置、顕微鏡からなる光計測システムにより、時計遺伝子発現と細胞内カルシウム濃度を指標とし、神経細胞の概日リズムを数日間測定することを試みました。

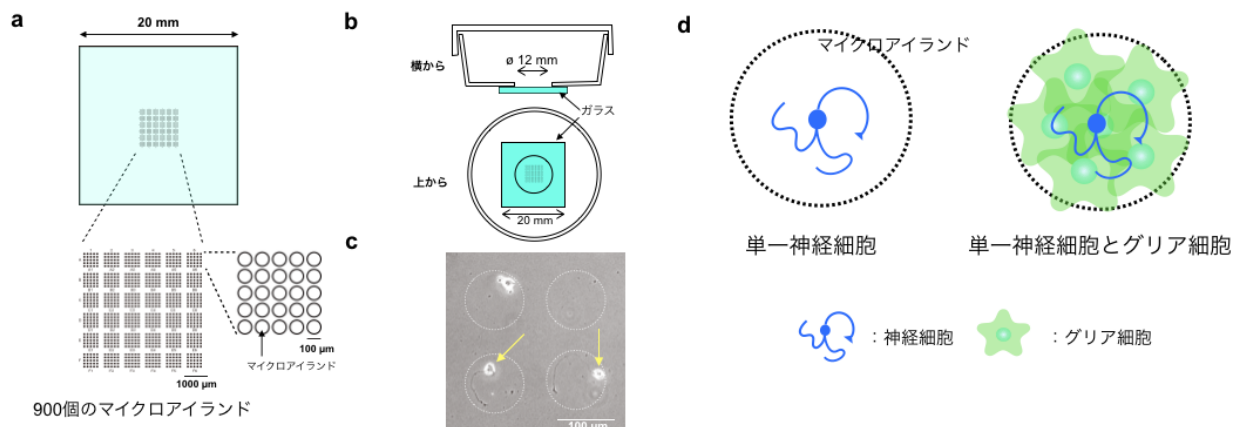


図 1. マイクロアイランドによる単一神経細胞の培養法

微細加工技術によりガラス表面に同一形状の多数のマイクロアイランド (直径 100 μm) を作成する (a)。培養ディッシュに多数のマイクロアイランドが形成されたガラスを貼り付けた培養皿を作成し (b)、視交叉上核から単離した神経細胞を培養する (c, 黄色矢印)。マイクロアイランド内には 1 個の神経細胞のみ (d, 左)、あるいは 1 個の神経細胞とグリア細胞が共存して存在する (d, 右)。

【研究成果】

視交叉上核の独立した 1 個の神経細胞のみで長期培養をおこない概日リズムを測定したところ (図 1d), 視交叉上核の単一の神経細胞は, 他の神経細胞やグリア細胞と物理的接触 (シナプス結合やギャップ結合) が一切ない状態においても (図 2a), 安定した時計遺伝子と細胞内カルシウムの概日リズムを示す事が明らかとなりました (図 2b, c)。一方で, グリア細胞と共存している 1 個の神経細胞のカルシウム概日リズムは, 多くで概日リズムが見られなくなることも明らかとなりました。

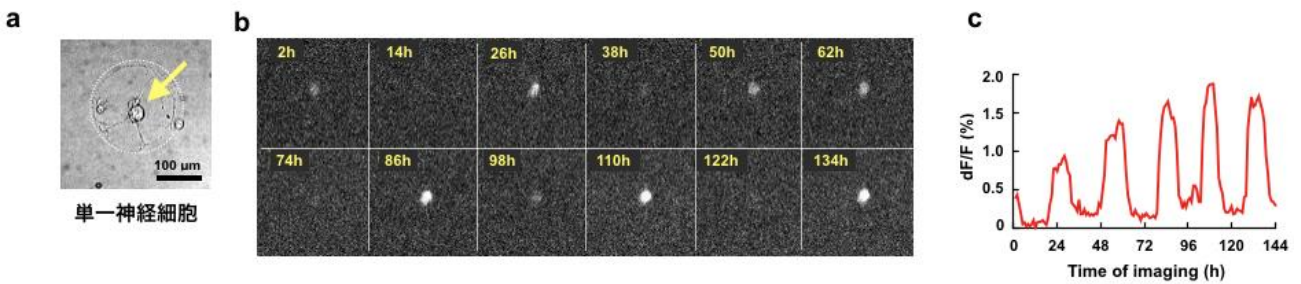


図 2. 物理的に隔離した単一の神経細胞における細胞内カルシウム濃度の概日リズム

単一のマイクロアイランド内に培養した単一の神経細胞 (a)。細胞内カルシウムセンサーにより蛍光変化を長期間観察すると, 約 24 時間周期のカルシウムリズムが観察される (b, c)。

【今後への期待】

本研究成果は, 長年議論されてきた単一神経細胞における概日リズムの有無の問題に終止符を打つとともに, 概日リズムの基礎的なメカニズムの全容解明に向けたさらなる理解に繋がると考えられます。近年, 概日リズムの乱れによる睡眠障害や生活習慣病が問題となっており, そのメカニズムの解明と治療法や予防法を開発することは現代社会の解決すべき重要課題の一つとなっています。本研究成果は, これらの課題に対して基礎研究の一つとして寄与するものと期待されます。また微細加工技術を用いたマイクロパターニングによる単一細胞の培養技術と細胞機能の可視化法は, 概日リズムを調節する薬剤の高速評価法への応用に繋がるものと期待されます。

【謝辞】

本研究は, 北海道大学大学院医学研究院の時間医学講座 (寄附講座, 当時) で行われたものであり, 本間研一名誉教授, 本間さと客員教授, 平田快洋特任助教 (当時), 織田善晃博士研究員 (当時) (現長崎大学歯学部), 同大学電子科学研究所の榎木亮介准教授 (当時) (現自然科学研究機構 生命創成探究センター), 同大学大学院情報科学研究院の繁富 (栗林) 香織特任准教授との共同研究の成果です。また本研究は, 科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業さきがけ, 文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金, 科学研究費補助金の支援のもとで行われました。

論文情報

論文名 Circadian rhythms in *Per1*, *PER2* and Ca^{2+} of a solitary SCN neuron cultured on a microisland.(マイクロアイランド上で培養された SCN 単一ニューロンにおける *Per1*,*PER2* および Ca^{2+} の概日リズム)

著者名 平田快洋*¹, 榎木亮介*^{1,*2,7}, 繁富(栗林)香織^{3,4}, 織田善晃*^{1,*5,6}, 本間さと^{1,5}, 本間研一^{1,5} (¹北海道大学大学院医学研究院, ²北海道大学電子科学研究所, ³北海道大学高等教育推進機構, ⁴北海道大学大学院情報科学研究院, ⁵北海道大学脳科学研究教育センター, ⁶長崎大学大学院医歯薬学研究科歯学部, ⁷大学共同利用機関法人自然科学研究機構生命創成探究センター) *当時の所属

雑誌名 *Scientific Reports*

DOI 10.1038/s41598-019-54654-5

公表日 2019年12月4日(水)(オンライン公開)

お問い合わせ先

大学共同利用機関法人自然科学研究機構生命創成探究センター

准教授 榎木亮介(えのきりょうすけ)

TEL 0564-59-5258 FAX 0564-59-5256 メール enoki@nips.ac.jp

URL <http://www.med.hokudai.ac.jp>

配信元

北海道大学総務企画部広報課(〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

【用語解説】

- *1 概日リズム … 地球上のあらゆる生物が持つ約 24 時間周期の生体リズム。体内時計, 生物時計ともいう。
- *2 視交叉上核(しこうさじょうかく) … 哺乳類の概日リズムの中核として役割を担っている脳領域。網膜からの外界の光情報を受け, 視交叉上核で作られられた概日リズム情報を全身に送り出している。
- *3 グリア細胞 … 神経細胞を取り巻く脳細胞。神経細胞に栄養を供給するとともに, 神経細胞の活動を調節する重要な働きを持つことが近年次々と明らかになってきている。
- *4 時計遺伝子 … 体内時計のリズム作りだしている遺伝子群。細胞内の時計遺伝子の発現と, 遺伝子から作られるタンパク質の合成とその分解のサイクルによって概日リズムが生成される。
- *5 微細加工技術 … 半導体作成時に使用される微小領域にナノメートルオーダーで精細な加工を施すことができる技術。近年ではライフサイエンスの場でも使用されることが多くなってきている。