

睡眠覚醒リズムに関わる中枢時計安定化機構の光イメージング解析

平田 快洋

北海道大学大学院 医学研究科 連携研究センター 光バイオイメージング部門

1. 概要

本研究では、睡眠覚醒リズムを担う生物時計の中枢である視床下部視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) の個々の神経細胞リズムの振る舞いとリズム同期の安定化に関わる神経基盤を明らかにすることを最終的な目標とし、それら目的達成のために実験系の構築および改良を行った。特に、時計遺伝子発現をホタルルシフェラーゼや不安定化 GFP などモニタリング可能なトランスジェニックマウスを用い、SCN の神経細胞 (シングルニューロン) を物理的・空間的に隔離された微小区画 (マイクロアイランド) で単離培養する方法を確立することにより、シングルニューロン内で起こる時計遺伝子発現リズムを光イメージング法により長期間 (おおよそ一週間) リアルタイムで可視化し、解析を行った。

2. 序論

24 時間社会の到来で、長時間労働・不規則労働に伴う睡眠障害や高齢化に伴う睡眠障害などにより我が国の成人人口の 20%以上が何らかの睡眠障害を訴えている。また、交替勤務や時差ボケからくる概日リズムの慢性的な障害は、免疫機能低下を招くだけでなく耐糖能の低下や高血圧発症など生活習慣病の温床となっている。哺乳類の生物時計の神経基盤を明らかにすることは、ヒトのこれら睡眠覚醒リズム障害の診断や有効な治療法開発につながると期待される。

脳内の視床下部視交叉上核 (SCN) は、睡眠覚醒リズムを担う哺乳類の生物時計 (概日リズム) の中枢である。この脳領域は、両側でおよそ2万個のニューロンからなり、それらが同期的活動を行うことで約 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することが明らかにされている。単一細胞内では複数の時計遺伝子の転写と蛋白産物による転写抑制の feedback loop が基盤となっていることが近年示されてきた (総説として、Reppert & Weaver, *Nature* 2002; Ko & Takahashi, *Hum Mol Genet* 2006)。その一方で、SCN の組織としては同期的な活動を示すものの、個々の細胞になると極めて不均一な性質を示すことが明らかとなっている (Welsh et al., 1995; Liu & Reppert, 2000)。おそらく、SCN の活動はニューロン間のコミュニケーション (神経回路網あるいは液性調節) によって誘導されると考えられる。また SCN は、体温変動や各種ストレスに対しても安定し

たりズムを刻むと共に、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。SCNは、組織解剖学的に異なる2つの区画からなり、各々、異なる神経ペプチド（AVP, VIP）を産生するニューロンがSCN内で別々に局在する（Abrahamson & Moore, *Brain Res* 2001）。異なる神経ペプチドを持つ個々のニューロンの時計遺伝子発現の振る舞いやそれらニューロンの同期メカニズムを細胞分子学および神経生理学的に詳細に明らかにすることは、SCNニューロン群の同期的活動を理解する上でも極めて重要であるが、未だ十分な知見は得られていない。また、SCNは、多種の自律発振を示すニューロンのネットワークから形成されると考えられてきているが、これまで個々の神経細胞機能とネットワークを介する振動の安定化、広範な環境応答性については知る手段が非常に限られ、ほとんど研究されてこなかった。

そこで本研究では、各々のニューロンが物理的・空間的に完全に独立した細胞培養系を確立し、シングルニューロンレベルからSCN内の同期メカニズム、安定化機構を明らかにしていく。その目的達成のために、SCNシングルニューロン培養系（微小区画-マイクロアイランド-培養法）を開発・確立して

いくことを第一の目標とし研究を行なった。またその培養系を用いて時計遺伝子発現リズムを光イメージング手法にて記録し解析することを試みた（Fig. 1）。

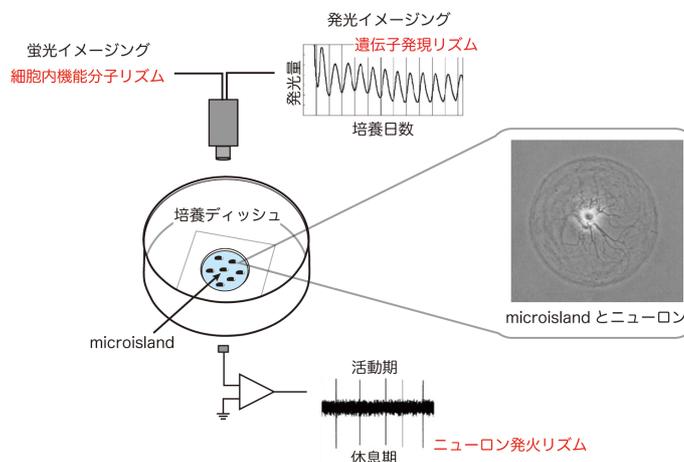


Fig. 1 シングルニューロンからの時計遺伝子発現リズム等の光イメージング法による長期間リアルタイム測定の概略図。

3. 材料と方法

以下に、今回実験に用いた材料とその方法を簡単に説明する。

3-1. 動物

本研究では、実験動物としてリアルタイムで遺伝子発現や蛋白レベルを蛍光あるいは発光でモニタリング可能な *Per1-luc* トランスジェニックマウス、*Per1-GFP* トランスジェニックマウス、*PER2::LUC* ノックインマウスを用いた。すべての動物は、自由な給餌条件で、かつ、12時間毎の明暗サイクルの下で飼育管理された。

3-2. 微小区画（マイクロアイランド）培養法

アガロース（0.15%）でコーティングしたカバーガラス上に、30cm以上離れた距離より噴霧器を用いてコラーゲン（rat tail collagen, type 1A）溶液を噴霧することで直径50~300 μ m程度のマイクロアイランドを形成した。カバーガラスは、シリコーンを用いて、中央に約1cmの穴の開いた35mm培養ディッシュの底面部へ貼り付け乾燥させた。その後、UVで滅菌処理した後、培養直前に培養液を用いて数回洗浄し培養実験に使用した。

3-3. シングルニューロン培養

SCNニューロンを培養するために、生後2~4日齢の仔マウスを本実験で使用した。麻酔下で仔マウスより脳を摘出し、テッシュチョッパーにより直ちに厚さ300 μ mの切片を作成した。顕微鏡下で切片からSCNを単離し、氷冷した培養液中に回収した。10匹前後の個体からSCNを回収した後、パパインを用いて酵素処理を行い、ニューロンを単離した。軽い遠心後、沈殿した細胞塊を培養液にて再回収し、フィルターメンブレンを用いて濾過した。回収したニューロン数を計数した後、 1×10^4 個/mlの密度となるよう溶液を再調整し、マイクロアイランドの形成してあるガラスボトム培養ディッシュ上に蒔き、実験開始直前までCO₂インキュベーター内で培養を行った。培養液は、1週間に2回交換を行った。

3-4. 極低密度分散培養系

シングルニューロン培養法と同様にSCNニューロンを分離・回収した後、コラーゲンコーティングしてある培養ディッシュに、ニューロン数が数千個/mlの密度となった培養液を蒔き、実験開始直前までCO₂インキュベーター内で培養を行った。

3-5. 光イメージング記録

リアルタイムで遺伝子発現をモニタリングするために、測定開始直前に培養液をD-Luciferin (1 μ M)含有DMEM/HEPES培養液に交換した。培養ディッシュは、培養液の蒸発を防ぐためにフィルムでシールされ、37度に加温された測定装置上に配置した。シングルニュー



Fig. 2 長期測定用発光イメージング装置:Luminoview。Box直下にEMCCDが装着されている。

ロン培養系の実験では、発光イメージング装置として EMCCD カメラを搭載した Luminoview (オリンパス製) (Fig. 2) または Cellgraph (アトー製) を用いて測定を行った。おのおのの測定では、59 分間露光、1 分間インターバルで 96-120 時間 (4-5 日間) の連続測定を行っている。一方、極低密度分散培養系は、光電子増倍管 (PMT) を搭載した Lumicycle (Actimetrics 製) を用いて測定を行った。Lumicycle では、1 分間露光、10 分間インターバルで 4-5 日間の連続測定を行った。

4. 結果

シングルニューロン培養法では、 1 cm^2 あたり、直径 $50\text{-}300\ \mu\text{m}$ 程度の大きさのマイクロアイランドが 100 個弱存在していた。(Fig. 3)。また、その中に十数個のマイクロアイランド上にニューロン様の細胞が培養できていることを確認した。一方で、単一のニューロンがアイランド上で培養できているものは 10 個以下であった。そこで、まず始めに、シングルニューロン培養系で SCN 由来のニューロンが目的通りマイクロアイランド上で培養できているか確かめるために、免疫染色法を用いて調べた。

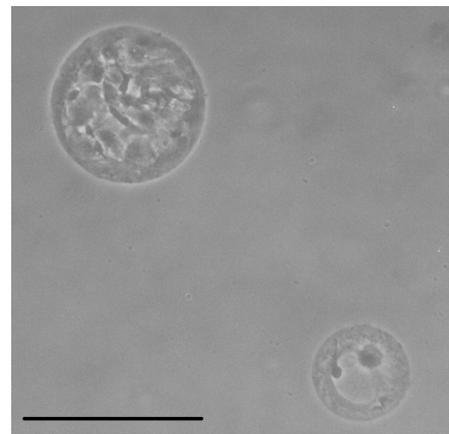
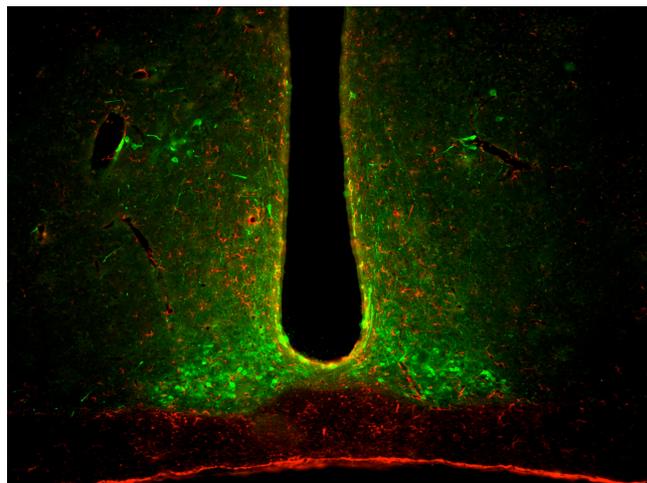


Fig. 3 マイクロアイランド。
Scale bar: $300\ \mu\text{m}$.

組織としての SCN では神経ペプチド (AVP と VIP) を含むニューロン群が視交叉直上に局所的に集まっていることが知られている。第一に、免疫染色を行うに辺り使用する抗体の感受性を確かめる目的で、厚さ $50\ \mu\text{m}$ の組織切片を用いて SCN の免疫染色を行った。その結果を、Fig. 4 に示す。組織切片においては、抗神経ペプチド抗体 (抗 AVP 抗体) で免疫染色すると、AVP 陽性細胞が視交叉直上に核を作って存在していることを極めて感度良く検出することが出来た。



次に、シングルニューロン培養法によって隔離培養した細胞の

Fig. 4 SCN の免疫二重色画像。ニューロンを抗 AVP 抗体 (green)、グリア細胞を抗 GFAP 抗体 (red) で染色した。

染色を行った。抗神経ペプチド抗体（抗 AVP 抗体）で免疫染色すると、Fig. 5 のように小さなマイクロアイランドに樹状突起および軸索を広げたニューロンが極めて低密度で存在していた。この結果は、シングルニューロン培養法によって SCN 由来のニューロンを確実に培養できていることを示す。

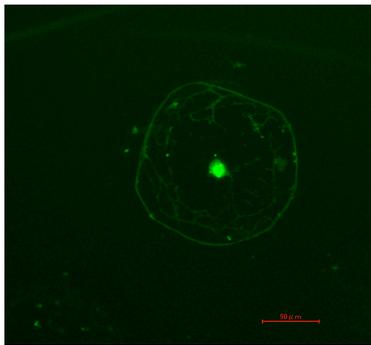


Fig. 5 マイクロアイランド上で培養された AVP 陽性シングルニューロン。

シングルニューロン培養系において SCN 由来のニューロンが培養できていることが確認できたので、次いで、シングルニューロンより時計遺伝子 *per1* の発現リズムを発光イメージングにより検出することを試みた。免疫染色の結果同様、シングルニューロンが培養できているとみられるマイクロアイランドは極めて少なかった。ニューロン様の細胞が観察できたマイクロアイランドから発光イメージングを行ったが、周期性を持つ発光シグナルは検出できなかった。現時点において、シングルニューロン培養系から SCN ニューロンより時計遺伝子 *per1* の発現にともなう

周期性をもった発光シグナルは検出できていない。

一方、極低密度分散培養系では、 1mm^2 あたり細胞が 20-40 個の密度で培養を行った。まず、SCN ニューロンの神経伝達物質である GABA に対する抗体とグリア細胞のマーカーである GFAP に対する抗体で免疫染色を行ったところ、GABA 陽性細胞が低密度で存在していることが確認できた (Fig. 6)。

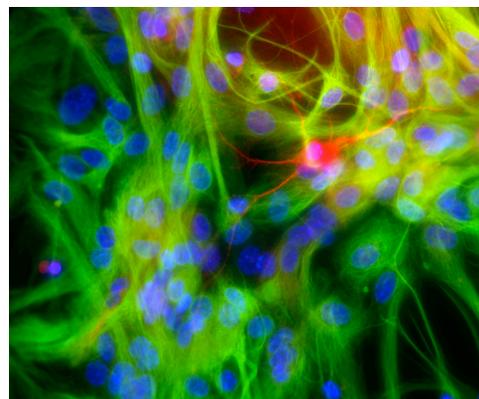
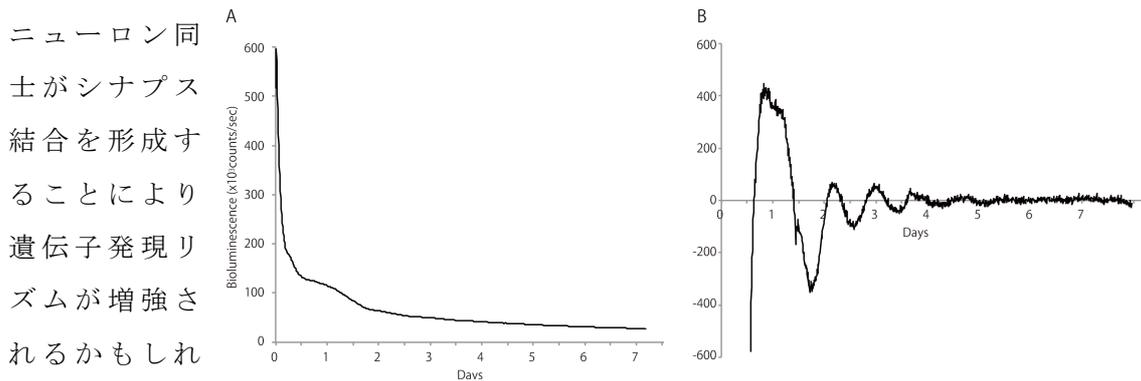


Fig. 6 グリア細胞とニューロン。ニューロンを抗 GABA 抗体 (red)、グリア細胞を抗 GFAP 抗体 (green)、核を DAPI (blue) で免疫染色した。

次いで、極低密度分散培養系でも発光検出装置 (Lumicycle) にて時計遺伝子 *per1* の発現リズムを検出することを試みた。その結果、低密度分散培養系では、測定開始直後に大きな発光値を示し時間とともに減衰するシグナルを検出した。このシグナルは、測定始後 1 2 時間後に第一ピークを示した。検出したシグナルを数値処理したところ、シグナルの振幅は小さいながらも微かな発光リズムを捉えることが出来た (Fig. 7)。

以上の結果をまとめると、シングルニューロンレベルでは、発光イメージングで検出できる顕著な遺伝子発現リズムを示さないかもしれない可能性がある。また一方で、



ニューロン同士がシナプス結合を形成することにより遺伝子発現リズムが增强されるかもしれない可能性もある。

Fig.7 超低密度分散培養系における *per1* 遺伝子発現に伴う発光シグナル。A) 生データ。B) A のデータを処理解析した事により明らかとなった発光リズム。

5. 考察

本研究では、物理的・空間的に完全に独立したシングルニューロン培養系（微小区画培養法）を確立し、SCN のシングルニューロンレベルから、SCN 内のニューロン同期メカニズムにアプローチしてきた。しかしながら、コラーゲンのマイクロアイランドを用いた単一ニューロン培養系において、時計遺伝子 *per1* の発現リズムを発光イメージングにより検出することは出来なかった。

このことについて、以下の理由が考えられる。1) 時計遺伝子発現は、単一のニューロンにおいては現在の発光イメージングによる検出限界を超える低いレベルで起こっている。その為、発光イメージングによるリズム検出には至らなかった。2) 一枚の培養ディッシュあたり記録できるニューロンが一個と限られていたため、実際に記録を行った細胞が SCN 由来のニューロンではなかった。3) 単一のニューロンにおいては、時計遺伝子のリズム的な発現は起こっていない。1) および 2) の可能性が高いが、3) の可能性も完全には否定出来ない。それぞれの可能性を調べるために、今後は、現在 100 個/cm² 以下のマイクロアイランド数自体を増やしていき、個々のアイランド上で確実にニューロンを培養出来るようにしていく。さらに、マイクロアイランド上のニューロン数そのものを増やしていくことで、ニューロン数（ネットワーク形成）によるリズムの增强・同期の可能性を探っていく。

一方で、低密度分散培養系においては、時計遺伝子 *per1* の発現リズムを捉えることが出来た。しかしながら、このリズム現象には、ニューロン自体の遺伝子発現リズム、あるいはニューロンとグリア細胞の遺伝子発現リズムを同時に捉えている可能性がある。グリア細胞のみでも時計遺伝子の発現リズムが起こることが報告されてきている (Prole.

et al., 2005) ので、今後、低密度分散培養系における発光イメージングでは、個々のニューロンから記録を行うことが出来る CCD で光イメージング記録を行なっていく、ニューロン由来のリズムとグリア細胞由来のリズムの分離し、解析を行っていく予定である。

6. 今後の展望

本研究にておこなったシングルニューロン培養法では、ニューロンが確率的にマイクロアイランド上へ生着するため極めて非効率であると同時に、アイランド上のニューロン数をコントロールすることが困難であった。シングルニューロンの培養をより効率的に行うために、現在、マイクロアイランド上に SCN シングルニューロンが培養出来るようなマイクロアイランドの条件（コラーゲンタイプ、アイランドサイズ）あるいはニューロン密度等を再検討し実験を繰り返しているところである。さらに、フォロサーマルエッチング法 (Kojima et al, 2003) を分散培養系に応用することでマイクロアイランドを培養直後に形成させ、そこにニューロンを培養させる新たに実験に着手したところである。フォトサーマルエッチング法を用いると、マイクロアイランド上にシングルニューロンを培養することが容易となるだけでなく、マイクロアイランド内に存在するニューロン数を比較的容易に操作することができるという大きなメリットがある。今後は両方法を用いることで、シングルニューロン培養系とニューロン数を制御した培養系から、ニューロンのリズム発生メカニズム（遺伝子発現リズムおよび電気的活動リズム）、その同期機構の分子・生理学的メカニズムの解明を目指し研究を行っていく。

7. 謝辞

本研究は、中山科学振興財団による研究助成により行われた。その支援に対し、心より御礼申し上げます。

8. 参考文献

Abrahamson EE., Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.*, 916; 172-191 (2001)

Ko CH., Takahashi J. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 15; R271-R277 (2006)

Kojima K., Moriguchi H., Hattori A., Kaneko T., Yasuda K. Two-dimensional network formation of cardiac myocytes in agar microculture chip with 1480 nm infrared laser photo-thermal etching. *Lab Chip*, 3; 292-296 (2003)

Liu C., Reppert S.M. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25; 123-128 (2000)

Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418; 935-941 (2002)

Prolo L.M., Takahashi J.S., Herzog E.D. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J Neurosci.*, 25; 404-408 (2005)

Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14; 697-706 (1995)