

氏 名 たけうち こうへい  
竹内 公平

学 位 の 種 類 博 士 (理学)

学 位 記 番 号 富生命博甲第 81 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

専 攻 名 生体情報システム科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

学位論文題目 視交叉上核モデル細胞におけるセロトニン受容体の発現  
と機能

論 文 審 査 委 員  
(主査) 教授 池田 真行  
教授 松田 恒平  
教授 川原 茂敬

## 学位論文内容の要旨

### 視交叉上核モデル細胞におけるセロトニン受容体の発現と機能

#### 生体情報システム科学専攻

#### 竹内 公平

自然界に存在するほぼすべての生物は、反応や生理活性に約 24 時間周期の概日リズムを示す。こうした概日リズム振動は、時計遺伝子群の自己転写フィードバックループにより制御されていることは、今日広く知られている。一方で、哺乳動物においては、間脳視床下部に位置する視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) が体内時計中枢として機能していることもよく知られており、このことは、外科的な SCN 切除や、SCN 特異的な時計遺伝子欠損が、個体行動リズムの消失を招くことから伺える。SCN は直径 0.5 mm、約 1 万個の神経細胞の集合体から形成される神経核であり、個々のニューロンは、分散培養条件下で、活動電位自発発火リズムに概日周期性が認められる。また、大多数の SCN ニューロンは、網膜視床下部路 (Retinohypothalamic tract: RHT) からのグルタミン酸作動性の投射を受け、これにより環境の明暗情報に同調している。つまり、環境の光情報は、AMPA/NMDA 型グルタミン酸受容体を介した興奮性のシナプス応答として受け取られ、それによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員が、SCN ニューロン内の時計遺伝子転写リズムをリセットすると考えられている。一方で、SCN は多様な性質のニューロンを内包しており、SCN に固有な体内時計振動機構や、SCN ニューロンの神経活動調節機構については、今なお不明な点が多い。中脳縫線核を起始核とするセロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) ニューロンは、SCN へも軸索投射することが知られており、RHT 終末からのグルタミン酸放出を抑制的に制御したり、あるいはポストシナプティックに SCN 神経活動を調節することが知られている。よって、5-HT 受容体アゴニストやアンタゴニストは、リズム調節薬の開発ターゲットとして注目されている。一般に、5-HT 受容体には 14 種類のサブタイプが存在することが知られており、それらのうち SCN には、5-HT<sub>1A</sub>, 1B, 2A, 2C, 5A, 7 の 6 種類のサブタイプが発現していることが報告されている。一方で、こうした多様な 5-HT 受容体発現が、どのように SCN の概日リズム制御に関与するのかについては、まだ不明な点が多い。こうした背景から、本研究では、ラット SCN、培養 SCN アストロサイト、および胎生期ラット SCN プロジェニター細胞から作成されたモデル細胞 (SCN2.2 細胞) のそれぞれにおいて、5-HT 受容体遺伝子発現プロファイルを解析した。また、SCN2.2 細胞に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  センサータンパク質 (YC3.6) を安定発現させた細胞株 (SCN2.2-YC) を作成し、SCN プロジェニター細胞の細胞応答を、未分化および分化誘導条件下で比較することを試みた。以下にその詳細を示す。

#### ① リアルタイム PCR を用いた 5-HT 受容体サブタイプの発現解析

成体ラットの脳を明期開始時刻から 6 時間ごとに摘出し、クライオスタットを用いて厚さ 100  $\mu\text{m}$  の連続視床下部切片を作成し、内径 0.5 mm のフラットトップ注射針で、SCN をパンチアウト・採取した。その SCN サンプルをバイオマッシャーによりホモジナイズし RNA を抽出した。このサンプルをリアルタイム RT-PCR 法により 5-HT 受容体サブタイプ (5-HT<sub>1A</sub>, 2A, 2C, 5A, 7) 発現量を測定したところ、時刻に依存しない、高い 5-HT<sub>2C</sub> 遺伝子の発現が検出された。さらに、生後発生変化や、RHT 軸索終末部 (プレシナプス) における遺伝子発現の影響を解析するために、本実験では生後すぐに脱眼処

理を施したラットから同様にリアルタイム RT-PCR 解析を行った。しかしながら、その値は無処理のものとは有意な差はなかった。また、アストロサイトにおける遺伝子発現の影響を解析するために、3 日齢 SCN の生きた脳スライスを作成し、これを分散培養した。その後、高カリウム処理によりニューロンを選択的に除去し、SCN 由来の培養アストロサイトを作成した。しかしながら、SCN 由来アストロサイトでは、5-HT<sub>2A</sub>, 2B 受容体のみ発現しており、5-HT<sub>2C</sub> 遺伝子発現は認められなかった。つまり、以上の結果をまとめると、5-HT<sub>2C</sub> 遺伝子は、SCN ニューロンのポストシナプスに発現していることを意味している。SCN2.2-YC 細胞における、5-HT 受容体発現プロファイルは、未分化および下記②に示した分化誘導処理を施した細胞について、それぞれ検討した。その結果、未分化・分化のいずれの場合にも、SCN ニューロンと同じ 5-HT<sub>2C</sub> 遺伝子の発現が認められた。一方で、アストロサイトで観察された 5-HT<sub>2A</sub> の発現も認められたことから、少なくとも 5-HT 受容体は、完全に成熟したニューロンタイプの発現パターンとは言い難いことも明らかとなった。

## ② SCN2.2 細胞の分化誘導

SCN2.2-YC 細胞の分化誘導にはインスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、コレラトキシン、ホルボール-12-ミリスター-13-アセテートの 5 つの因子を加えた培地を用い、7 日以上培養したものを利用した。まず、免疫蛍光染色により神経細胞骨格マーカー (MAP2) とアストロサイト細胞骨格マーカー (GFAP) の発現の有無を検証したところ MAP2 の発現のみ認められた。また、時計遺伝子 (*Per1*) プロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポーターを導入し、時計遺伝子転写リズムを解析したところ、分化・未分化を問わず概日リズムが観察可能であった。これらの結果は、SCN2.2-YC 細胞には概日ペースメーカーの性質が内在していることを示唆している。一方で、ボルテージクランプレコーディングにより電位依存的な Na<sup>+</sup>カレントの解析を試みたが、分化・未分化を問わず Na<sup>+</sup>カレントは記録できなかった。つまり、SCN2.2-YC 細胞は、活動電位発火リズムを介した情報出力機能を有していないことが明らかとなった。

## ③ Ca<sup>2+</sup>イメージングによる受容体応答解析

SCN2.2-YC に発現する YC3.6 を蛍光レシオイメージングによりモニターし、5-HT 受容体刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変動を解析した。その結果、(i) 5-HT 刺激は濃度依存的に、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすこと、(ii) この Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>放出により引き起こされていること、(iii) 分化誘導処理により、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を示す細胞数が増加することなどが明らかとなった。また、様々な選択的アゴニストやアンタゴニストの投与実験により、5-HT 誘発性 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は、恐らく 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介して引き起こされることが示唆された。本研究では、さらに蛍光 Ca<sup>2+</sup>インジケーター (Fura2-AM) で染色した SCN 急性脳スライスにおける細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変動についても解析を試みたが、この場合においても同様に 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観察された。これらの結果は、リアルタイム RT-PCR を用いた 5-HT 受容体遺伝子の解析結果と矛盾しないものである。また、概日 Ca<sup>2+</sup>濃度リズムの有無についても解析を試みたが、SCN2.2-YC 細胞では、SCN ニューロンで報告されている概日 Ca<sup>2+</sup>濃度リズム (Ikeda et al, *Neuron* 2003) は存在しないことが明らかとなった。つまり、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルのレベルにおいても、リズム出力の機能は欠落していることが示唆された。

本研究では、体内時計ニューロンのモデル化や、時計プロジェニターから時計ニューロンへの分化誘導について取り組み、5-HT 受容体発現等、一部の機能では成熟ニューロンに近い性質をモデル細胞で再現することに成功した。一方で、活動電位形成や細胞内 Ca<sup>2+</sup>リズム形成など、ニューロンとしての重要な機能をモデル細胞で構築するには至っておらず、今後の研究課題である。

## 【論文審査の結果の要旨】

竹内公平君は、博士研究において、哺乳動物の体内時計中枢として知られる視床下部視交叉上核（SCN）の分子神経メカニズムの解明を目指し、その神経プロジェクター由来のモデル細胞である SCN2.2 細胞の機能解析を行った。SCN は約 1 万個の神経細胞からなる神経核であるが、内包する神経細胞は多様性に富み、体内時計ペースメーカーニューロンとしての機能発現に不可欠な仕組みについては、これまでよくわかっていない。SCN2.2 細胞は胎生期ラット SCN をガン化して得られたヘテロジニアスな細胞集団であり、その移植により SCN 破壊ラットの行動リズムが回復することが米国の研究グループにより報告されていた。竹内君は、この SCN2.2 細胞集団から、蛍光カルシウムイオンセンサー（YC3.6）の安定発現株を作成し、発現するセロトニン受容体サブタイプや高カリウム刺激応答性を指標に、成熟 SCN ニューロンの性質に近い細胞株（SCN2.2YC）のサブクローニングを行った。さらに、SCN2.2YC に最適な分化誘導プロトコールの探索を行い、細胞分裂の停止と、神経突起伸長を誘発する分化誘導培地を決定した。一方で、分化・未分化を問わず SCN2.2YC 細胞には電位依存性ナトリウムカレントや、概日細胞内カルシウム濃度リズムが観察されないことを明らかにし、つまり、この培養条件下では、なお時計ニューロンの完全な性質が再現できないことも明らかにした。体内時計研究の分野では、時計遺伝子のクローニングが行われて以来、研究の主軸が時計遺伝子の転写翻訳機構に集中してきたが、そうした研究の多くは、繊維芽細胞など時計機能と無関係な細胞が用いられてきた。SCN に内在する固有の神経機構の解析はまだ始まったばかりであり、本研究成果は、体内時計ニューロンのモデル化に道を開いた意味において高く評価できるものである。これら一連の研究成果は、内外の学会で発表されたほか、ネイチャーパブリケーショングループの発刊するオンライン科学総合誌 *Scientific Reports* に筆頭著者として論文掲載されており、その内容は十分に博士号に値するものと判断した。