

平成 27 年度 博士論文

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

富山大学大学院 生命融合科学教育部 生体情報システム科学専攻

31381101 竹内公平

目次

要旨 1

序論 3

材料および方法 4

結果 8

考察 11

参考文献 13

図表

要旨

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 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_{1A}, 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 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 μm 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_{1A}, 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_{2C} 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_{2A}, 2B 受容体のみ発現しており、5-HT_{2C} 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_{2C} 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_{2C} 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_{2A} 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-ミリスチート-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、ボルテジクランプレコーディングにより電位依存的な Na⁺カレントの解析を試みたが、分化・未分化を問わず Na⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺濃度上昇を引き起こすこと、(ii) この Ca²⁺濃度上昇は細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺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、Ca²⁺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 Ca²⁺濃度上昇は、恐らく 5-HT_{2C} 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 Ca²⁺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 Ca²⁺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_{2C} 受容体を介した Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺濃度リズム[1]は存在しないことが明らかとなった。つまり、細胞内 Ca²⁺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、時計プロジェク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、活動電位形成や細胞内 Ca²⁺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いないものの、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。

序論

視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN)は約 1 万個の神経細胞からなる神経核であり、哺乳類の振動ペースメーカーとして機能している [2]。SCN では時計遺伝子が自己転写フィードバックループにより概日周期で発現しており、外部からの光情報の入力時計遺伝子の発現リズムの調節に重要な役割を果たしている。出生後初期の網膜視床下部路(Retinal hypothalamic tract; RHT)の発達に伴い、網膜で受け取った光情報がグルタミン酸を介して SCN に伝えられるようになり、これにより起こる SCN への Ca^{2+} 導引が転写因子 CREB を介した時計遺伝子の発現リズムをリセットし、外部環境と時計遺伝子の発現リズムを同調させる。SCN が未発達な胎生期は出生までの期間、振動ペースメーカーを母体と共有していることが知られており[3]、出生後初期の RHT 形成に伴い、RHT 軸索終末から放出されるグルタミン酸を介した光情報の入力を受けるようになる。これは SCN においてグルタミン酸毒性によるニューロンの減少とアストロサイトの増加、すなわち SCN の再編成を引き起こす[4,5,6]。これにより新生児は外部環境のリズムに同調できるようになり、発火リズムが発達することが知られている[7,8,9]。しかしその概日時計の発達に基づく神経メカニズムは明らかにされていない。

上記の神経調節に加えて、SCN は中脳縫線核からのセロトニン性の神経支配を受けており[10]、SCN における 5-HT 含有ニューロン数は、生後発達とともに増加する[11]。成熟個体において、中脳縫線核を起始核とするニューロンから放出される 5-HT は SCN のみならず、RHT 軸索終末に発現している 5-HT 受容体にも受け取られ、RHT 軸索終末からのグルタミン酸放出を抑制的に制御することによって、光入力を調節することが知られている[12,13]。現在確認されている 14 種類のセロトニン受容体サブタイプのうち、5-HT_{1A}, 1B, 2A, 2C, 5A, 7 受容体の 6 種類が SCN において発現していることが知られており、5-HT_{2A/2C} 受容体のアゴニストである DOI を RHT が発達したラットに投与すると、SCN が活性化して c-Fos 発現量が増加する[14]ことをはじめ、SCN に発現している 5-HT 受容体サブタイプの機能について様々な報告があげられている[15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27]。しかし、生後発生にともなう 5-HT 受容体発現および機能の変化に関する報告は未だない。

SCN2.2 細胞はラット SCN プロジェニター細胞を癌化した細胞群である。SCN2.2 細胞はアデノウイルスベクター、12S E1A 遺伝子を胎生期 18 日のラット SCN プロジェニター細胞に導入することで癌化された[28]。SCN2.2 細胞は癌化することで SCN よりも培養が容易になり、また様々な発生段階の細胞を含むヘテロ細胞群であるという特性を有する。加えて SCN2.2 細胞に発現する多様な時計遺伝子には SCN と同様の発現リズムがみられる[29]。また SCN2.2 細胞を SCN 欠損ラットに移植することによって行動リズムが回復することも報告されていることから[30]、SCN2.2 細胞が潜在的に概日ペースメーカーとして機能するというを示している。

本研究は SCN ニューロンおよび SCN2.2 細胞における 5-HT 受容体発現プロファイルを解明するとともに、SCN2.2 細胞の SCN のモデル細胞としての有用性を検証するため、5-HT 受容体の発現量を測定するとともに Ca^{2+} センサーである Yellow cameleon3.6 (YC3.6) 遺伝子を SCN2.2 細胞に導入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を観察した。

材料および方法

SCN から単離したアストロサイトの培養

SD ラットの飼育は 12:12 の明暗条件下、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ でいつでも飲水、摂食できる環境下で行った。出生後日数 2-3 日のラットの腹腔内に 50 mg/kg ペントバルビタールを投与して脳を摘出し、ビブラトームを用いて氷冷 High Mg^{2+} 人工脳脊髄液 (ACSF) 中で 400 μm の SCN 含有冠状脳スライスを作製した。さらに SCN 含有領域をトリミングして緩衝液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 19.7 mM HEPES, 35 mM NaHCO_3 , 41.3 μM カナマイシン) に移した。8 匹のラットから同様に SCN を回収した後、遠心分離 (1000 rpm、5 分間) し、上澄み液を 0.025 %トリプシン含有緩衝液と交換し、緩やかに懸濁して細胞間の接着を弱める。37°C ウォーターバスで 15 分間振とうした後、再度遠心分離 (1000 rpm、5 分間) し、上澄み液を DNase/トリプシンインヒビター含有緩衝液と交換した。それを優しく攪拌し、40 μm ナイロンメッシュセルストレーナー (BD Falcon, Bedford, MA) に通してから培養フラスコに細胞をまいた。この SCN ニューロンとアストロサイトからなる初代培養細胞を 37°C の CO_2 インキュベーターで培養した。フラスコいっぱいまで培養した細胞を High K^+ 緩衝生理食塩水 (High K^+ BSS; 73 mM NaCl, 60 mM KCl, 2.7 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 1 mM Na_2HPO_4 , 10 mM グルコース、10 mM HEPES/NaOH (pH 7.3) で 1 時間処理することで、ニューロンの死滅を促し、培養フラスコに接着している細胞を新しい培養フラスコに移して再度培養、最終的にアストロサイト細胞骨格マーカーの免疫染色により、アストロサイトであることを確認した。

SCN2.2-YC 細胞の作製

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ラミニン (Gibco) 溶液を加えて一晩静置することでディッシュをラミニンコートし、癌化させた SCN2.2 細胞を撒いた。培養は 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA)、3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ グルコース、292 mg/ml L-グルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA) からなる培養液を用いて、37°C、5% CO_2 条件下で行った。

SCN2.2 細胞への YC3.6 遺伝子の導入には、ゼオシン耐性を有するベクター (pcDNA3.1/zeo; Invitrogen) を用い、リポフェクション法により導入した後、400-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゼオシン含有培地で培養することでゼオシン耐性遺伝子発現細胞を選別した。選別後に残ったコロニーをクローニングリングで採取し、96 穴ウェルプレートでサブクローニングした。これらのうち、High K^+ 刺激に対して Ca^{2+} 応答を示した細胞株を保管し、実験に用いた。

SCN2.2-YC 細胞の分化誘導

SCN2.2-YC 細胞の分化誘導には、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン、10 nM 亜セレン酸ナトリウム、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリンの 3 つの因子を serum-free Ham's F12/DMEM に加えた 3F 培地、そこに 10 ng/ml コレラトキシンを加えた 4F 培地、さらに 10 ng/ml ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) を加えた 5F 培地の 3 種類の培地をそれぞれ用いた。コレラトキシンを加えることで細胞の形態変化が顕著になり、PMA を加えると細胞の生存率が増加した。

リアルタイム RT-PCR 解析

解析には、成熟 SD ラット (300-450 g、60-70 日齢) を利用。実験に用いる一部のラットには RHT

形成阻害のため2日齢の時点で脱眼処理を施した。成熟した後、無処理の個体と眼球を摘出した個体に50 mg/kg のペントバルビタールを腹腔内投与し、麻酔がかかったのを確認してから脳を摘出し、ドライアイスで急速に脳を凍結した。凍結した脳を-20℃のクライオスタットチャンバーに設置し、OCTコンパウンドで包埋した後、100 µm の厚さの凍結脳スライスを作製してそれをスライドガラスに移し、内径 0.51 mm の 21G 注射針を加工して作製したパンチャーを用いて、氷上で SCN 含有領域をパンチアウトした。パンチアウトした SCN を Buffer RLT (RNeasy mini kit; Qiagen, Chatsworth, カリフォルニア) 600 µL に移し、氷上でバイオマッシャー (フナコシ, 東京, 日本) による攪拌 (2500 rpm、30 秒間) で細胞破碎した。直後に 70%エタノール 600 µL を加えて RNA を抽出するまで-80℃で保存した。25 mm² フラスコで培養した SCN2.2-YC 細胞と SCN アストロサイトに関しては、90%コンフルになった後、PBS で培地を洗浄して PET 1 mL を加えて 3 分間 37℃でインキュベーションすることで細胞をフラスコから剥がし、1.5 mL RNase free チューブに移して遠心分離 (1000 rpm、5 分間) し、PET を除去した後、Buffer RLT 350 µL を加えてバイオマッシャーによる攪拌 (2500 rpm、30 秒間) で細胞破碎した。70%エタノール 350 µL を加えて RNA を抽出するまで-80℃で保存した。

付属のプロトコルに従い、RNeasy mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した Total RNA を Quanti Tect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) で逆転写し、cDNA を得た。PCR では以下の 22 種類のプライマーを利用した。

5-HT1A receptor forward, 5'-CGTGCACCATCAGCAAGGA-3';
5-HT1A receptor reverse, 5'-CTGAAGATGCGCCCGTAGAGA-3';
5-HT2A receptor forward, 5'-ACCGCTATGTCGCCATCCA-3';
5-HT2A receptor reverse, 5'-GACCTTCGAATCATCCTGTAGTCCA-3';
5-HT2C receptor forward, 5'-ACCCGTTCCAGTAAGTGTGTTTC-3';
5-HT2C receptor reverse, 5'-TCCCATTCCAAGGTGTGCAA-3';
5-HT5A receptor forward, 5'-GAAGATTTACAAGGCTGCGAAGT-3';
5-HT5A receptor reverse, 5'-GCGTGACGGACAGTGAACA-3';
5-HT7 receptor forward, 5'-CAGTACCGGAATATCAACCGGAAG-3';
5-HT7 receptor reverse, 5'-CCAGGGTTCCACTCTGGATCA-3';
Per2 forward, 5'-AGCAGTCCCCTACAGCTTAACCT-3';
Per2 reverse, 5'-CCGAGATGCGCCAGATGT-3';
MAP2 forward, 5'-CCTCTTCTGGAAGCATCAAC-3';
MAP2 reverse, 5'-GTAACAATTACTACAGTTGG-3';
calretinin forward, 5'-CTGGAGAAGGCAAGGAAAGGT-3';
calretinin reverse, 5'-GGCAGAGCTGGCGCAGATCC-3';
calbindin-D28k forward, 5'-GACGCTGACGGAAGTGGTTAC-3';
calbindin-D28k reverse, 5'-TCCGGTGATAGCTCCAATCC-3';
GFAP forward, 5'-TGGCCACCAGTAACATGCAA-3';
GFAP reverse, 5'-CAGTTGGCGGCGATAGTCAT-3';
GAPDH forward, 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3';
GAPDH reverse, 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

PCR 反応液 (7.5 µL 2×Rotor-Gene SYBR Green, 0.3 µL Forward プライマー (50 µM), 0.3 µL Reverse

プライマー (50 μ M) , 0,35 μ L テンプレート cDNA, 6.55 μ L RNase free water) を 15 μ L 作製後、0.1 mL Strip Tube (QIAGEN) に分注し、Rotor gene 3000A (CORBETT RESERCH) にセットした。ホールド温度と時間を 95°C、5 分間、変性の温度と時間を 95°C、5 秒間、アニーリング/エクステンションステップの温度と時間を 60°C、10 秒間として PCR を実施した。

免疫蛍光染色

SCN2.2-YC 細胞をガラスボトムディッシュに移して、30-40%コンフルエントになるまで再度培養し、ガラスボトムディッシュから培地を除去して PBS で洗浄した後、4% PFA を用いて室温で 5-15 分間処理することで SCN2.2-YC 細胞を固定した。PFA を除去後 PBS で洗浄し、PBS を溶媒として作製したブロッキングバッファー (10% Donkey serum, 0.005% TritonX-100) を用いて暗所で 2 時間振とうすることでブロッキングした。ブロッキングバッファー除去後 PBS で洗浄し、5% Donkey serum, 0.005% TritonX-100 含有 PBS に 1:200 の割合で希釈した一次抗体をガラスボトムディッシュに加えて冷暗所で一晩振とうすることで一次抗体反応させた。ディッシュを PBS で洗浄後、5% Donkey serum, 0.005% TritonX-100 を含む PBS に 1:200 の割合で希釈した二次抗体を加えて室温で 2 時間振とうした。PBS でディッシュを洗浄後、冷却 Charge-coupled device (CCD) カメラ (DS-5Mc, Nikon) を備えた倒立顕微鏡 (TE-2000, Nikon) を使用して蛍光画像を撮影した。

電気生理学的手法

12-14 日齢の Wister Rat に 50 mg/kg のペントバルビタールを腹腔内投与し、十分に麻酔がかかった状態で脳を摘出後、ビブラトームを用いて厚さ 300 μ m の SCN 含有脳スライスを作製した。脳スライスを normal ACSF (124 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM グルコース) でインキュベート (室温、1 時間) した後、正立顕微鏡 (BX-50WI; オリンパス, 東京, 日本) のステージにセットし、酸素をバブリングさせた normal ACSF を室温で毎秒 1 mL の割合でレコーディングチャンバーにかん流させ、CCD カメラ (C2741-79; 浜松フォトニクス) を用いて SCN ニューロンを撮影した。電極内は 150 mM CsCH₃SO₃, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, 3 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP (pH 7.3; 電極抵抗: 3-6 M Ω) からなる薬液で満たし、パッチクランプアンプ (Axopatch 200B; Axon Instruments, Union City, カリフォルニア) を用いて電位を -60 mV に固定して、ホールセルボルテージクランプレコーディングを実施した。アンプの出力は A/D コンバーター (Digidata 1200; Axon Instruments) によってデジタル信号に変換し、data acquisition software (pCLAMP 8; Axon Instruments) を用いてハードディスク状にレコーディングデータを記録した。

Ca²⁺イメージング

Fura2 Ca²⁺イメージングには 11-14 日齢の SD ラットの SCN 含有脳スライスを用いた。上記の方法で厚さ 220 μ m の SCN 含有脳スライスを作製し、95% O₂, 5% CO₂ をバブリングさせた normal ACSF (138.6 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 21 mM NaHCO₃, 0.6 mM D-グルコース, 2.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) 中で 30 分間静置した。normal ACSF を除去し、10 μ M Fura2, 10 nM Pluronic F-127 (invitrogen, Molecular Probes) 含有 ACSF と交換して暗所で 45 分間静置することで SCN 含有脳スライスを染色した。暗所で新しい normal ACSF に脳スライスに移して 30 分間静置して脳スライスを洗浄後、脳スライスを専用のチェンバーに移して顕微鏡のステージにセットし、ACSF を還流させた。

培養細胞の蛍光共鳴エネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer ; FRET) Ca^{2+} イメージングには、ラミネンコートしたガラスボトムディッシュで培養した細胞を用いた。培地を取り除き、緩衝生理食塩水(BSS; 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM グルコース, 10 mM HEPES-NaOH, 2.0 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2) と交換し、かん流させた。細胞の観察には正立型蛍光顕微鏡(AxioSkop, Carl Zeiss)、水浸レンズ(Achroplan $\times 10$ NA0.75, Carl Zeiss)を用い、フィルターホイール(LB 10-2, SUTTER INSTRUMENT CO.)で励起光の波長を制御し、175W キセノンランプによる紫外光から Fura2 Ca^{2+} イメージングでは 340 nm と 380 nm、FRET Ca^{2+} イメージングでは 440 nm 波長の励起波長を選択的に利用した。紫外光はバランスフィルターを挿入した励起光フィルターを備えたダイクロイックミラー(FT395 nm, Carl Zeiss)で反射し、2つの励起光から得られた蛍光はバンドパスフィルター(BP485-515 nm, Carl Zeiss)を透過して 6 秒間隔で CCD カメラ (CoolSnap-fx, Photometrics)で撮影した蛍光画像を取り込んだ。画像の解析には MetaFluor ver6.2 (Universal Image Corporation)を用いた。

長期 Per-Luc 発光イメージング

実験には 35 mm ガラスボトムディッシュで、40-50%コンフルエントになるまで培養した細胞を用いた。mPer1 遺伝子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遺伝子である PL18 遺伝子導入プラスミド 1.0 μL と、無血清 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) 50 μL を混ぜ、一方で 50 μL の無血清 DMEM と 1.0 μL の Lipofectamine 2000 (invitrogen) を混ぜて 2 種類の混合液を用意し、5 分間室温で静置した後、両液を混合させて 20 分間室温で静置した。ガラスボトムディッシュ中の培地を新しい 500 μL の無血清 DMEM と交換し、プラスミドと Lipofectamine 2000 の混合液を加えてゆっくりと混ぜ合わせ、ディッシュを 37°C の CO_2 インキュベーターに移して 3 時間培養した後、ディッシュ内の培地を 1 mL の DMEM と交換して 24-36 時間後に細胞を実験に使用した。

測定開始 1-2 時間前にガラスボトムディッシュから培地を除去し、500 μM luciferin (Pregma) を含む新しい DMEM に交換した。3 次元圧力モーター駆動性マニピュレーター (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) により、倒立顕微鏡 (TE-2000s, Nikon) ステージに取り付けた温度制御特注チェンバー上に設置し、長期 Per-Luc 発光イメージングを開始した。測定中はステージ上の温度を約 33°C に維持し、20 倍対物レンズ (PlanFlour20 \times NA0.50) を用いて観察し、冷却 CCD カメラで撮影した。

結果

ラット SCN における 5-HT 受容体発現プロファイル

明期開始時刻から 6 時間ごとに摘出した脳から得られた SCN パンチアウトを用いてリアルタイム RT-PCR 法により 5-HT 受容体サブタイプ (1A, 2A, 2C, 5A, 7) および mRNA 発現リズムのポジティブコントロールとして時計遺伝子の *Per2* の mRNA 発現量を測定した。時刻別の mRNA 発現量を比較したところ、5-HT 受容体サブタイプはいずれにおいても mRNA 発現リズムは認められなかった。一方時刻に依存しない高い mRNA 発現が 5-HT_{2C} 受容体で検出された。これらの結果は 5-HT 受容体サブタイプのうち、5-HT_{2C} 受容体が SCN において主要に働いているものであることを暗示している (Fig. 1a)。続いて、RHT 軸索終末における 5-HT_{2C} 受容体発現の有無および生後発生による 5-HT_{2C} 受容体発現の変化を明らかにするため、出生後 2 日目のラットに脱眼処理を施すことで RHT 形成を阻害し、5-HT_{2C} 受容体発現量を出生後経過日数ごとに測定した。脱眼個体、無処理個体ともに 5-HT_{2C} 受容体は 7-15 日にかけて急速に発現量が増加する S 字型の推移を示し、両個体間で有意な差は認められなかった (Fig. 1b)。

SCN2.2 細胞における 5-HT 受容体サブタイプの発現パターン

明期に摘出した脳から得られた SCN パンチアウト、培養 SCN アストロサイトおよび SCN2.2 細胞における 5-HT 受容体サブタイプを測定し、発現パターンを解析した。SCN パンチアウトにおいては、5-HT_{2C} 受容体が最も多く、5-HT_{2B} 受容体が最も少ない。かついずれの 5-HT 受容体サブタイプの発現もみられた (Fig. 2a)。培養 SCN アストロサイトにおいては、5-HT_{2A} および 2B 受容体のみの発現が認められ (Fig. 2b)、SCN2.2 細胞では 5-HT_{2A} 受容体のみ発現がみられた (Fig. 2c)。SCN2.2 細胞に YC3.6 を安定発現させた SCN2.2-YC 細胞に関しては、未分化および 5F 培地による分化後細胞ともに 5-HT_{1A}, 2A, 2B, 2C 受容体の発現がみられ、5-HT_{5A}, 7 受容体の発現は認められなかった (Fig. 2d, e)。培養 SCN アストロサイトにおいて強い発現のみられた 5-HT_{2A} 受容体が発現しており、5-HT_{5A}, 7 受容体が発現していないという点で、SCN ニューロンにおける発現パターンとは異なっていたものの、様々な発生段階の細胞を含むヘテロ細胞集団である SCN2.2 細胞からのスクリーニングにより、5-HT_{2.2}-YC 細胞はより SCN ニューロンに近い発現パターンを示すようになった。

SCN2.2-YC 細胞における神経細胞骨格マーカー (MAP2) およびアストロサイト細胞骨格マーカー (GFAP) の発現

免疫蛍光染色により MAP2 と GFAP を観察したところ、未分化 SCN2.2-YC 細胞において MAP2 のみ発現が認められた (Fig. 3a)。GFAP 発現のポジティブコントロールとして培養 SCN アストロサイトの GFAP の免疫蛍光染色も試みたところ、GFAP の発現が確認できた (Fig. 3b) ことから未分化 SCN2.2-YC 細胞において GFAP の蛍光が検出できないのは抗体および技術的な問題ではないと考えられる。さらにリアルタイム RT-PCR 法により未分化 SCN2.2-YC 細胞における MAP2 と GFAP、ニューロナル Ca²⁺結合タンパク質であるカルレチニンとカルビンディンの mRNA 発現量を測定したところ、MAP2 およびカルレチニンの発現が認められた (Fig. 3c, d)。

SCN2.2-YC 細胞における *Per1* 転写リズムと神経発火

ルシフェラーゼにより *Per1* 転写を可視化し化学発光イメージングを実施したところ、未分化 SCN2.2-YC 細胞において細胞分裂とは独立した *Per1* 転写リズムが認められた。この転写リズムは 5F 培地による分化誘導後 SCN2.2-YC 細胞においてもみられた。また SCN2.2-YC 細胞における *Per1* 転写リズムは細胞分裂サイクルと独立したものであると考えられる (Fig.4a, b)。一方でボルテージクランプレコーディングにより未分化 SCN2.2-YC 細胞および 4F 培地による分化誘導後 SCN2.2-YC 細胞における電位依存的 Na^+ カレントを測定し、ポジティブコントロールであるラット SCN ニューロンの結果と比較したところ、未分化、分化後いずれにおいてもラットニューロンのような Na^+ カレントを生じなかった (Fig.4c)。

SCN ニューロンにおける 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答

YC3.6 導入 SCN 含有脳スライスを用いた Ca^{2+} イメージングにより 5-HT 誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答が 5-HT_{2B/2C} 受容体アンタゴニストである SB221284 によって抑制されることが示された (Fig.5a)。また GABA-A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシン存在下であっても 5-HT および DOI 依存的細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答が観られた (Fig.5b)。生後 3-15 日に摘出したラット脳から作成した脳スライスを Fura-2AM で染色して Ca^{2+} イメージングを実施し、DOI 刺激に対して応答を示した細胞の割合を生後日数別に算出すると出生後 3-7 日では応答細胞の割合は約 3%であったが、10-11 日では約 7%、14-15 日では約 12%にまで増加した。これは 5-HT_{2C} 受容体の mRNA 発現量の変化と高い相関を示している。また SB-221284 はいずれの出生後日数においても DOI 依存的細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答を抑制した (Fig.5c)。加えて SB-221284 は DOI による神経発火も抑制した (Fig.5d, e)。

様々な刺激に対する SCN2.2-YC 細胞の応答

3F 培地と 4F 培地で培養することで分化誘導した SCN2.2-YC 細胞それぞれの形態を蛍光観察したところ、4F 培地で分化誘導した SCN2.2-YC 細胞では発達した突起が観られ、3F 培地で分化誘導したものに比べてよりニューロン様であることが示された (Fig.6a)。3F、4F、5F 培地それぞれで分化誘導した SCN2.2-YC 細胞に対して刺激を行い細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答を示した細胞数をカウントし、その割合を算出したところ、グルタミン酸、メラトニン、PACAP 刺激に対する応答はほとんどみられなかった。一方で High K^+ 刺激と 5-HT 刺激に対しては多くの細胞で応答がみられ、かつ分化誘導することによって応答細胞の割合が増加した。特に 5-HT では 5F 培地で分化誘導することで未分化の約 4.4 倍もの細胞が応答した。また 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答は 5-HT_{1A/7} 受容体アンタゴニストでは抑制されず、5-HT_{1A} 受容体アゴニスト (ブスピロン) および 5-HT_{1A/7} 受容体アゴニスト (8-OH-DPAT) で刺激しても応答はみられなかった (Fig.6b)。

SCN2.2-YC 細胞における 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答

SCN2.2-YC 細胞における 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 変動は濃度依存的であり、EC₅₀ は 660 nM であった (Fig.7a)。この応答は Ca^{2+} フリーバッファーのかん流により細胞外 Ca^{2+} を無くした状態でもみられたが、サプシガルジンにより細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させるとみられなくなった。 (Fig.7b, c)。5F 培地による分化誘導後 SCN2.2-YC 細胞に対し、5-HT_{1A/7} 受容体アゴニスト (8-OH-DPAT) および 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト (ブスピロン) で刺激すると Fig6b の結果同様ほとんどの細胞は応答を

示さず、また応答を示した一部の細胞において 5-HT 誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答が 5-HT_{1A/7} 受容体アゴニストにより抑制される例がみられた (Fig.8a)。他の 5-HT 受容体アンタゴニストが 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答に及ぼす影響をみたところ、5-HT₂ 受容体アンタゴニスト (リタンセリン) と 5-HT_{2B/2C} 受容体アンタゴニスト (SB-221284) により多くの細胞における 5-HT 刺激誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答が抑制された (Fig.8b, c)。加えて YC3.6 により可視化した細胞内 Ca^{2+} レベルを 6 日間測定し、SCN2.2-YC 細胞における概日 Ca^{2+} 濃度リズムの有無について解析を試みたが、SCN2.2-YC 細胞では SCN ニューロンで報告されている概日 Ca^{2+} 濃度リズム[1]は観察されなかった (Fig.9)。

考察

哺乳類の体内時計中枢 SCN では時計遺伝子が約 24 時間周期の概日リズムを示している。時計遺伝子の発現サイクルと外部環境の明暗サイクルの同調には外部からの光情報が重要な役割を果たしており、網膜で受け取られたほとんどの光情報は RHT を経由して SCN へ伝えられる。RHT 軸索終末から放出されるグルタミン酸が SCN において発現している AMPA/NMDA 型グルタミン酸受容体に受け取られることにより、SCN への Ca^{2+} 導引がおこり、転写因子 CREB を介して時計遺伝子の発現サイクルがリセットされる。このグルタミン酸投射は中脳縫線核を起始核とするニューロンから放出される 5-HT により抑制的に制御される。SCN ニューロンのプレシナプスとポストシナプスにおける多様な 5-HT 受容体サブタイプの発現が報告されており[18]、5-HT は RHT 軸索終末において発現している 5-HT 受容体を介してグルタミン酸投射の抑制、SCN において発現している 5-HT 受容体を介して神経活動を調節していると考えられる。実際 5-HT_{2C} 受容体が SCN の概日リズム制御に関与していることが報告されている[15]。しかし 5-HT 受容体の局在が影響を及ぼすことはまだ示されていない。本研究では 5-HT 受容体サブタイプの mRNA 発現量を測定することで、5-HT_{2C} 受容体が SCN に発現しており、RHT の形成による影響を受けず、また RHT 軸索終末に 5-HT_{2C} 受容体が発現していないことを示した。加えて SCN において DOI 誘発性の EPSC 増加がみられたことから 5-HT_{2C} 受容体が SCN のポストシナプスに発現していることが示唆された。また生後発生により 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現量は増加し、かつ SCN2.2-YC 細胞は分化誘導処理により 5-HT 誘発性の Ca^{2+} 応答を示す細胞の割合が増加することから、我々は 5-HT_{2C} 受容体の発現が SCN の発達と並行しているのではないかと推測した。しかし 5-HT_{2C} 受容体および神経細胞骨格を有し、かつカルレチニン陽性の SCN2.2-YC 細胞を分化誘導しても、活動電位形成や概日 Ca^{2+} 濃度リズムなどニューロンにおける重要な機能が欠落していたことから、5-HT_{2C} 受容体が SCN ニューロンにおける生理活性リズム形成の決定因子ではないことを示している。

本研究では SCN2.2-YC 細胞を分化誘導し、さまざまな 5-HT 受容体アゴニストおよびアンタゴニストで処理し、 Ca^{2+} イメージングにより細胞の応答を解析したところ、8-OH-DPAT、ブスピロンに Ca^{2+} 増加応答を示す細胞はほとんどみられず、かつ WAY-100635、SB269970 では 5-HT 誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答を抑制しなかった。このことから 5-HT_{1A/7} 受容体は少なくとも SCN ニューロンにおいて主に機能するものではないと考えられる。一方でリタンセリンと SB221284 は 5-HT 誘発性 Ca^{2+} 濃度増加応答を抑制し、RS-127445 は抑制しなかったことから 5-HT 誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答は 5-HT_{2C} 受容体を介して引き起こされていると考えられる。また SCN スライスを用いた Ca^{2+} イメージングでは 5-HT および DOI により細胞は応答を示し、いずれも SB-221284 によって抑制された。vitro および vivo において 5-HT_{2C} 受容体が *Per* 遺伝子転写を誘導しているという報告があり[31,32]、かつ SCN ニューロンに存在する 5-HT 受容体サブタイプの中で 5-HT_{2C} 受容体が最も多く発現することからも、5-HT_{2C} 受容体がラット SCN ニューロンにおける主要なサブタイプであると考えられる。しかし一方で 5-HT₇ 受容体ノックアウトマウスにおいて活動電位発火リズムの 5-HT 誘導性位相変異が観察されており、かつそれは WAY-100635 やリタンセリンによって抑制される[33]。これらの結果は、5-HT_{1A} 受容体と 5-HT₂ 受容体がともにマウスの概日リズム位相変異に関与していることを示している。さらに 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト (MKC-242) がハムスターの概日リズムの光同調を促進することが報告されている。ハムスター SCN において MKC-242 の光同調効果はリタンセリンではなく、WAY-100635 によって阻害された[16]ことから、5-HT₂ 受容体ではなく 5-HT_{1A} 受容体がハムスターの

概日時計の光調節に関与していることが示された。本研究における結果と先行研究から動物種によって概日リズム制御に関与する 5-HT 受容体サブタイプが異なると考えられる。

本研究で SCN における 5-HT_{2C} 受容体発現量は RHT 形成に関係なく 7-15 日にかけて急速に増加することを示した。これは出生後初期のラットに対し DOI を皮下注射することで RHT 形成に関係なく c-fos 発現が増加するという報告と一致する[15]。5-HT 含有軸索もまた生後発生時に急速に増加する[34]ことから、SCN における 5-HT_{2C} 受容体発現および神経機能の発達は中脳縫線核からの 5-HT 投射により促されていると考えられる。しかし培地に 5-HT (1 μ M) を加えるだけでは SCN2.2-YC 細胞は分化せず、ジブチリル-cAMP およびレチノイン酸を用いた場合も同様であった。我々は p53 細胞欠損マウス小脳から単離されたニューロンの分化誘導の成功が報告されている[35]4F 培地を用いることで SCN2.2-YC 細胞の形態変化を引き起こすことに成功した。Gs タンパク質活性化作用をもつコレラトキシンを付加することで SCN2.2-YC 細胞の形態変化が顕著になり、細胞分裂も抑制された。さらに PKC アクチベーターである PMA を付加すると細胞の生存率が上がり、かつ 5-HT に対する Ca²⁺応答を示す細胞の割合が増加した。しかしボルテジクランプレコーディングにおいて SCN2.2-YC 細胞はニューロン様の内向き Na⁺カレントを示さなかったことから、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になり、かつ概日 Ca²⁺濃度リズムも観られず、5-HT 受容体サブタイプの mRNA 発現にも影響を及ぼさなかった。すなわち本研究で用いた分化誘導処理では SCN ニューロンに備わっている機能を構築するに至っておらず、SCN プロジェニターのニューロンへの分化にはさらに他の因子が必要であると考えられる。

SCN2.2-YC 細胞における時計遺伝子転写リズムを解析するため、*Per1* ルシフェラーゼイメージングを実施したところ、分化未分化問わず *Per1* 転写に約 24 時間周期の概日リズムが認められた。また培地ごとに細胞分裂の影響を受けず、SCN2.2-YC 細胞間の *Per1* 転写リズムは同調を示した。時計遺伝子の転写リズムが細胞分裂周期と独立しているという点で、SCN2.2-YC 細胞は NIH3T3 繊維芽細胞と共通する性質を有するが[36]、一方で SCN2.2-YC 細胞における *Per1* 転写の振幅は小さく、NIH3T3 細胞でみられるような典型的な正弦波を示さなかった。同じシステムで *Per1* ルシフェラーゼシグナリングの明瞭なリズムの測定に成功していることから[37]、これらの結果は単なる技術的制限によるものではない。このことから SCN2.2-YC 細胞における時計遺伝子転写リズムは体内時計制御機構に関与する繊維芽細胞に比べて弱いと考えられる。SCN2.2-YC 細胞における *Per1* ルシフェラーゼの概日リズムの振幅や位相は分化処理による有意な変化はみられなかった。これは、機能的 5-HT 受容体が存在しても、SCN2.2-YC 細胞が概日ペースメーカーとして未成熟であるため、このような結果が得られたと考えることができる。培養 SCN ニューロンではしっかりと細胞内 Ca²⁺振動を示す[38, 39, 40]が SCN2.2-YC 細胞ではみられなかった。時計遺伝子発現は Ca²⁺導引をトリガーとして起るため[41]、概日 Ca²⁺濃度リズムは時計遺伝子発現サイクルのフィードバックを受ける[42, 43, 44]。SCN2.2-YC 細胞では *Per1* 転写リズムが弱いためフィードバックも弱いと考えられる。こう考えると、オリジナルの SCN2.2 細胞は繊維芽細胞との共培養モデルでは繊維芽細胞のリズムと同調することや[45, 46]、ミトコンドリアの Ca²⁺濃度の平均分布が日内変動を示すこととも矛盾しない。SCN 欠損ラットに SCN2.2 細胞を移植することによる概日リズムの回復機構は SCN2.2 細胞のみで実現できるものではなく、SCN2.2 細胞を移植した後、周囲の細胞群からの何らかの因子により、SCN2.2 細胞が神経系としての機能を獲得することによってもたらされると考えられる。その因子が何であるのかを明らかにすることは、SCN プロジェニター細胞を用いた体内時計中枢のニューロンモデルの作出において重要な課題である。

参考文献

1. Ikeda, M. *et al.* Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* **38**, 253-263 (2003).
2. Stephan, F.K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**, 1583-1586 (1972).
3. Deguchi, T. Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proc. Nat Acad Sci USA* **72**, 2814-2818 (1975).
4. Lavielle, M. & Servière, J. Developmental study in the circadian clock of the golden hamster: a putative role of astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* **86**, 275-282 (1995).
5. Müller, C. & Torrealba, F. Postnatal development of neuron number and connections in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *Brain Res Dev Brain Res* **110**, 203-213 (1998).
6. Ikeda, T. *et al.* Functional retinal input stimulates expression of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of postnatal developing rat. *Neurosci Res* **47**, 39-45 (2003c)
7. Shibata, S., Liou, S.Y. & Ueki, S. Development of the circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus of rat hypothalamic slices. *Neurosci Lett* **43**, 231-234 (1983).
8. Shibata, S., Oomura, Y., Liou, S.Y. & Ueki, S. Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in hypothalamic slice preparations. *Brain Res* **315**, 29-35 (1984).
9. Shibata, S. & Moore, R.Y. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Dev Brain Res* **34**, 311-315 (1987).
10. Meyer-Bernstein, E.L. & Morin, L.P. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* **16**, 2097-2111 (1996).
11. Ugrumov, M.V. *et al.* Development of the suprachiasmatic nucleus in rats during ontogenesis: serotonin-immunopositive fibers. *Neuroscience* **58**, 161-165 (1994).
12. Quintero, J. E. & McMahon, D. G. Serotonin Modulates Glutamate Response in Isolated Suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol* **82**, 533-539 (1999)
13. Rea, M.A., Glass, J.D. & Colwell, C.S. Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* **14**, 3635-3642 (1994).
14. Ferguson, S.A. & Kennaway, D.J. The ontogeny of induction of *c-fos* in the rat SCN by a 5-HT_{2A/2C} agonist. *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 229-231 (2000).
15. Kennaway, D.J. & Moyer, R.W. Serotonin 5-HT_{2c} agonists mimic the effect of light pulses on circadian rhythms. *Brain Res* **806**, 257-270 (1998).
16. Moriya, T. *et al.* Potentiating action of MKC-242, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, on the photic entrainment of the circadian activity rhythm in hamsters. *Br J Pharmacol* **125**, 1281-1287 (1998).
17. Moyer, R.W. & Kennaway, D.J. Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* **271**, 147-150 (1999).
18. Jiang, Z.G., Teshima, K., Yang, Y., Yoshioka, T. & Allen, C.N. Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* **866**, 247-256 (2000).
19. Duncan, M.J., Jennes, L., Jefferson, J.B. & Brownfield, M.S. Localization of serotonin_{5A} receptors in discrete

regions of the circadian timing system in the Syrian hamster. *Brain Res* **869**, 178-185 (2000).

20. Horikawa, K. *et al.* Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* **20**, 5867-5873 (2000).
21. Belenky, M.A. & Pickard, G.E. Subcellular distribution of 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* **432**, 371-388 (2001).
22. Kennaway, D.J., Moyer, R.W., Voultsios, A. & Varcoe, T.J. Serotonin, excitatory amino acids and the photic control of melatonin rhythms and SCN c-FOS in the rat. *Brain Res* **897**, 36-43 (2001).
23. Sprouse, J., Reynolds, L., Braselton, J. & Schmidt, A. Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT_{5A} receptors? *Synapse*. **54**, 111-118 (2004).
24. Gannon, R.L. & Millan, M.J. Serotonin_{1A} autoreceptor activation by S 15535 enhances circadian activity rhythms in hamsters: evaluation of potential interactions with serotonin_{2A} and serotonin_{2C} receptors. *Neuroscience* **137**, 287-299 (2006).
25. Smith, V.M., Sterniczuk, R., Phillips, C.I. & Antle, M.C. Altered photic and non-photic phase shifts in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuroscience* **157**, 513-523 (2008).
26. Gardani, M. & Biello, S.M. The effects of photic and nonphotic stimuli in the 5-HT₇ receptor knockout mouse. *Neuroscience* **152**, 245-253 (2008).
27. Gannon, R.L., Peglion, J.L. & Millan, M.J. Differential influence of selective 5-HT_{5A} vs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, or 5-HT_{2C} receptor blockade upon light-induced phase shifts in circadian activity rhythms: interaction studies with citalopram. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 887-897 (2009).
28. Earnest, D.J. *et al.* Establishment and characterization of adenoviral E1A immortalized cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol* **39**, 1-13 (1999).
29. Hurst, W.J., Earnest, D. & Gillette, M.U. Immortalized suprachiasmatic nucleus cells express components of multiple circadian regulatory pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 20-30 (2002).
30. Earnest, D.J. *et al.* Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science* **283**, 693-695 (1999).
31. Varcoe, T.J. & Kennaway, D.J. Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces *Per1* gene expression in the rat SCN in vitro. *Brain Res* **1209**, 19-28 (2008).
32. Varcoe, T.J., Kennaway, D.J. & Voultsios, A. Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces *Per* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Brain Res Mol Brain Res* **119**, 192-200 (2003).
33. Sprouse, J., Li, X., Stock, J., McNeish, J. & Reynolds, L. Circadian rhythm phenotype of 5-HT₇ receptor knockout mice: 5-HT and 8-OH-DPAT-induced phase advances of SCN neuronal firing. *J Biol Rhythms* **20**, 122-131 (2005).
34. Ferguson, S.A. & Kennaway, D.J. The ontogeny of induction of *c-fos* in the rat SCN by a 5-HT_{2A/2C} agonist. *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 229-231 (2000).
35. Honda, S. *et al.* Migration and differentiation of neural cell lines transplanted into mouse brains. *Neurosci Res* **59**, 124-135 (2007).
36. Nagoshi, E. *et al.* Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**, 693-705 (2004).
37. Morioka, E., Matsumoto, A. & Ikeda, M. Neuronal influence on peripheral circadian oscillators in pupal

Drosophila prothoracic glands. *Nat Commun* **3**, 909 (2012).

38. Sugiyama, T., Yoshioka, T. & Ikeda, M. mPer2 antisense oligonucleotides inhibit mPER2 expression but not circadian rhythms of physiological activity in cultured suprachiasmatic nucleus neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 479-483 (2004).
39. Enoki, R. *et al.* Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 21498-21503 (2012).
40. Hong, J.H., Jeong, B., Min, C.H. & Lee, K.J. Circadian waves of cytosolic calcium concentration and long-range network connections in rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* **35**, 1417-1425 (2012).
41. Balsalobre, A., Marcacci, L. & Schibler, U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* **10**, 1291-1294 (2000).
42. Ikeda, M. Response to Honma and Honma: do circadian rhythms in cytosolic Ca²⁺ modulate autonomous gene transcription cycles in the SCN? *Trends Neurosci* **26**, 654 (2003).
43. Ikeda, M. Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscientist* **10**, 315-324 (2004).
44. Hastings, M.H., Maywood, E.S. & O'Neill, J.S. Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr Biol* **18**, R805-R815 (2008).
45. Allen, G., Rappe, J., Earnest, D.J. & Cassone, V.M. Oscillating on borrowed time: diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts. *J Neurosci* **21**, 7937-7943 (2001).
46. Burkeen, J.F., Womac, A.D., Earnest, D.J. & Zoran, M.J. Mitochondrial calcium signaling mediates rhythmic extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus astrocytes. *J Neurosci* **31**, 8432-8440 (2011).

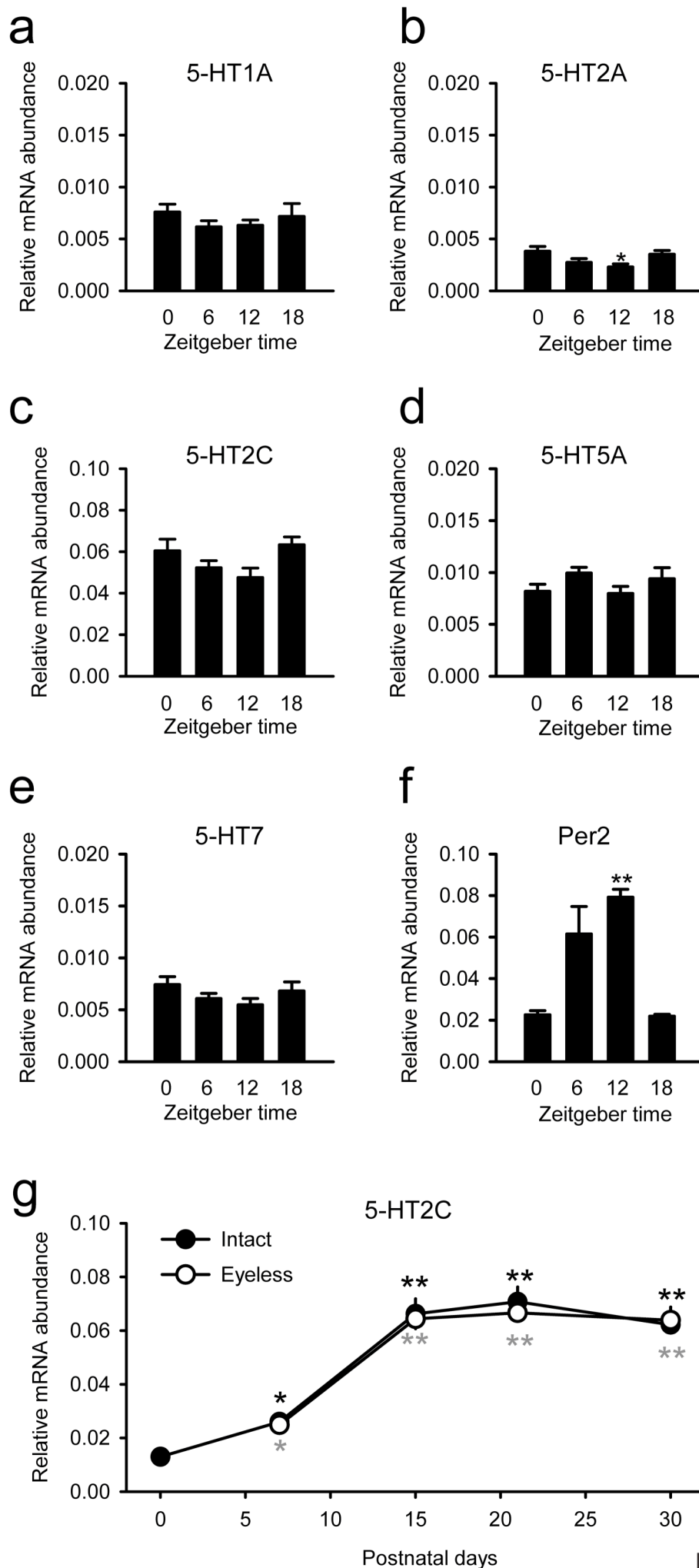


Figure 1

Figure 1. ラット SCN パンチアウトにおける 5-HT 受容体サブタイプ mRNA 発現の特徴。

リアルタイム RT-PCR 法により Zeitgeber time (ZT) 0, 6, 12, 18 の 4 点における 5-HT1A (a) , 2A (b) , 2C (c) , 5A (d) , 7 (e) の mRNA 発現量を測定し、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH を基準として各々の mRNA 発現量を比較定量した。リズム形成のポジティブコントロールとして時計遺伝子である *Per2* の mRNA 発現リズムを同様に測定した (f)。グラフ内の各値は 4-5 匹のラットから得られた測定結果の平均値であり、5-HT 受容体サブタイプの内、5-HT2A 受容体でのみ発現リズムが認められた (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA)。また 5-HT2C 受容体がいずれの時刻においても最も高い値を示した。RHT 形成と 5-HT 受容体サブタイプ発現の相関を明らかにするため、生後日数 0, 7, 15, 21, 30 の無処理個体 (●) と脱眼により RHT 形成を阻害した個体 (○) における、5-HT2C 受容体発現量を測定した。グラフ内の各値は 4-7 匹のラットから得られた測定結果の平均値であり、無処理個体、脱眼個体ともに 7-15 日にかけて急速に 5-HT2C 受容体発現量が増加する推移を示し、両個体間に有意な差は認められなかった (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test)。

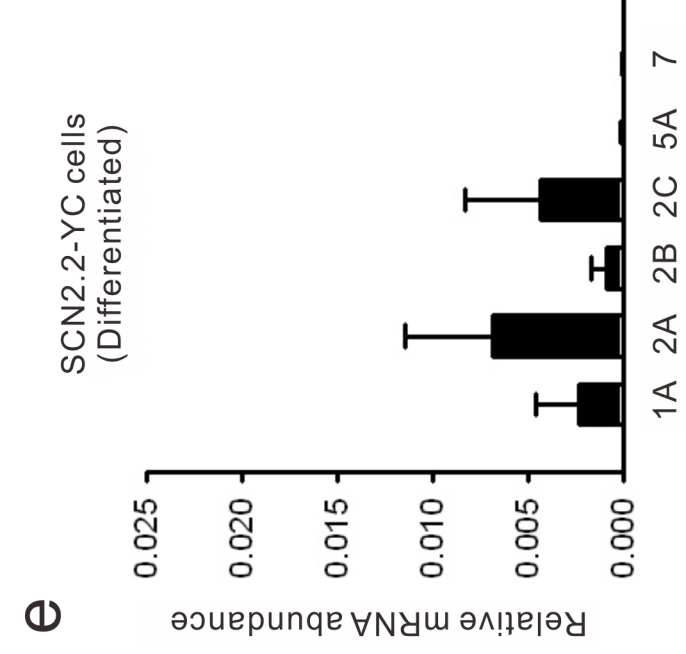
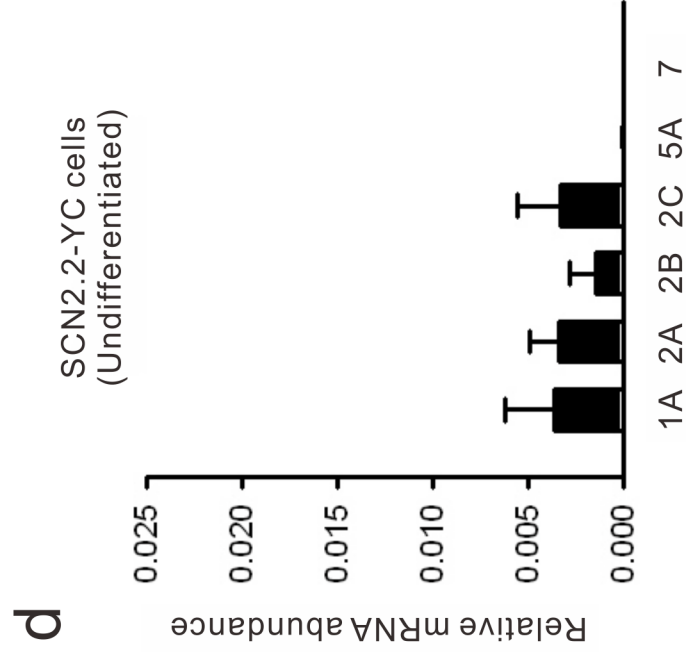
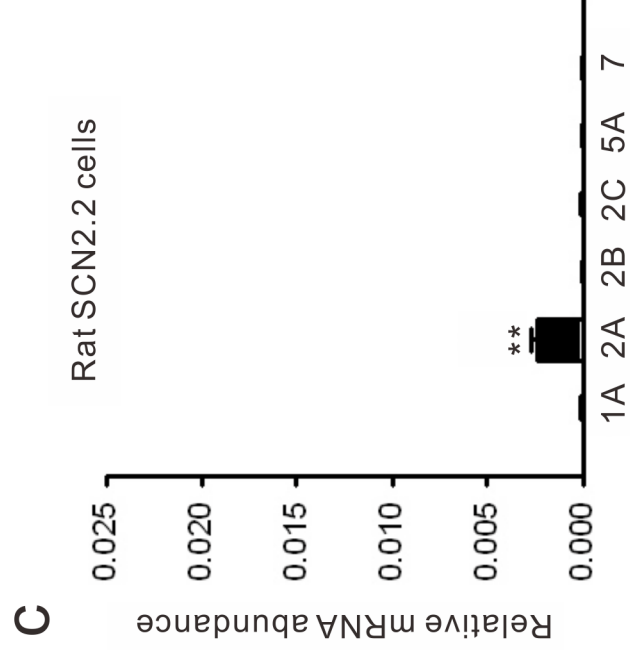
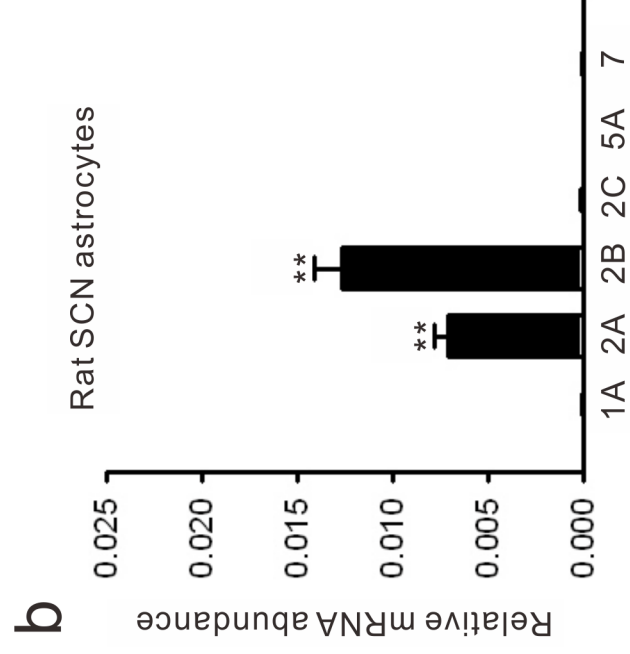
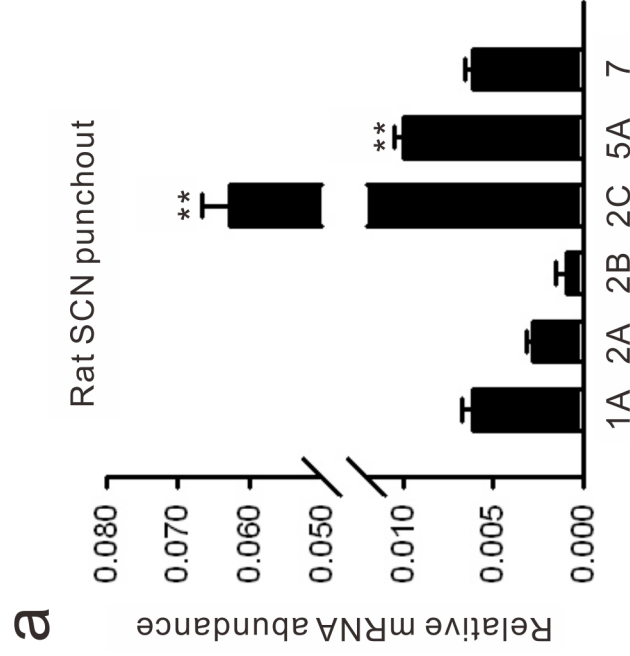


Figure 2

Figure 2. SCN パンチアウト、培養 SCN アストロサイトおよび SCN2.2 間の 5-HT 受容体サブタイプの発現パターンの比較。

(a) Fig1a-e で示した各々の 5-HT 受容体サブタイプの mRNA 発現量を採取時刻に関係なく平均化したデータ。5-HT_{2C} 受容体の発現量が最も多く、またいずれの受容体サブタイプの発現もみられる。(b) 生後日数 1-3 日の新生児ラットから採取した SCN を分散培養することで得られた SCN アストロサイトの初代培養細胞における 5-HT 受容体サブタイプの発現パターン。5-HT_{2A} と 2B 受容体の発現量が多く、他の受容体サブタイプの発現がみられない。あるいはほとんどない。(c) YC3.6 遺伝子導入前かつ分化誘導処理をしていない SCN2.2 細胞における 5-HT 受容体サブタイプの発現パターン。5-HT_{2A} 受容体発現のみみられる。(d) YC3.6 を遺伝子導入し、かつ分化誘導処理をしていない SCN2.2-YC 細胞における 5-HT 受容体サブタイプの発現パターン。5-HT_{1A}, 2A, 2B, 2C 受容体発現がみられるものの、発現量に有意な差がない。(e) YC3.6 を安定発現させ、かつ 5F 培地で培養することで分化誘導した SCN2.2-YC における 5-HT 受容体サブタイプの発現パターン。5-HT_{1A}, 2A, 2B, 2C 受容体発現がみられ、発現量に有意差はないものの、未分化細胞に比べて 5-HT_{2A}, 2C 受容体の発現量が増加する傾向がみられた。各グラフの値は 4-5 サンプルから得られた結果の平均値。 ** $P < 0.01$ (最小値と比較)、one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test 。

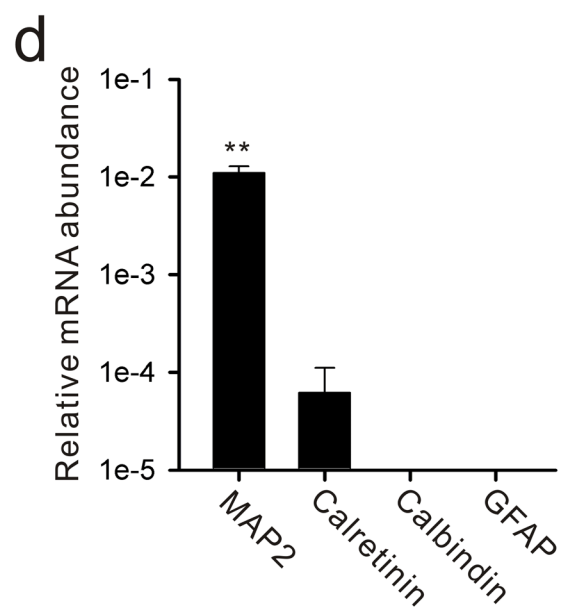
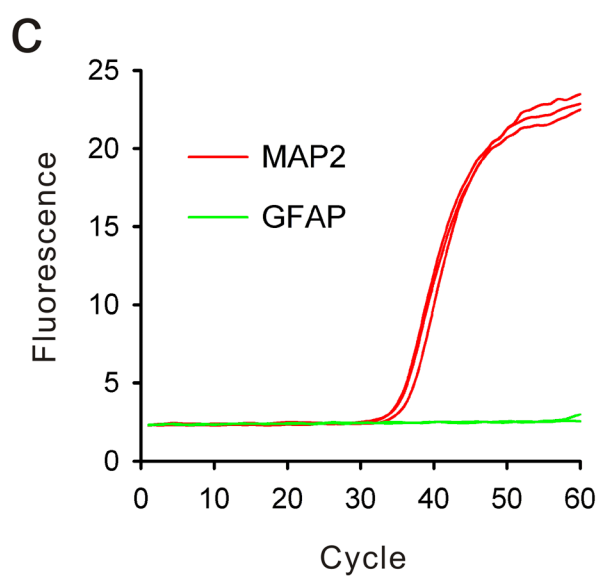
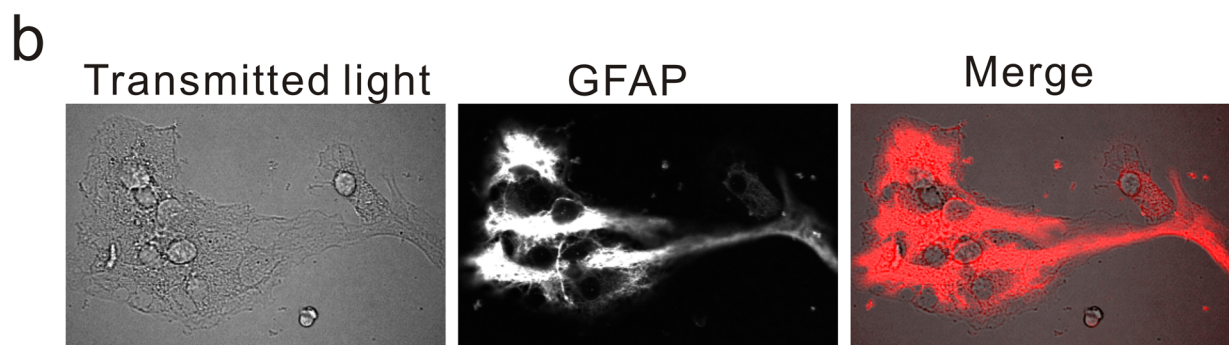
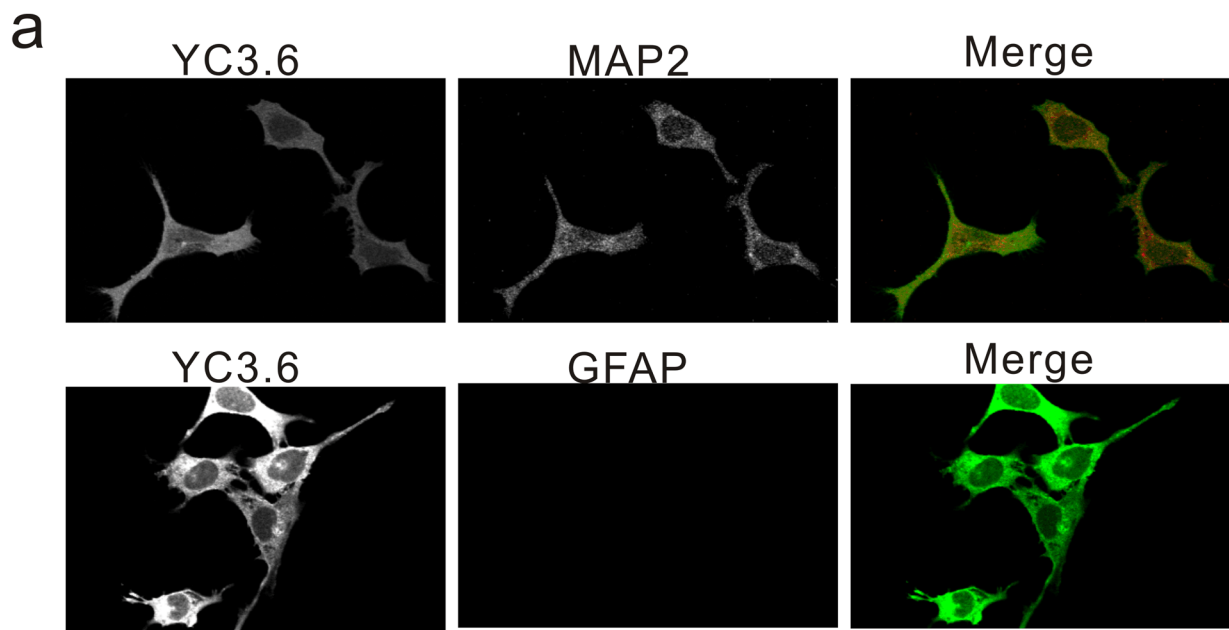


Figure 3

Figure 3. SCN2.2YC 細胞における細胞骨格の免疫蛍光染色。

(a) 神経細胞骨格マーカーである MAP2 とアストロサイト細胞骨格マーカーである GFAP をターゲットとした抗体を用いて SCN2.2-YC 細胞を免疫蛍光染色して得られた画像。SCN2.2-YC 細胞において MAP2 の発現はみられ、GFAP の発現はみられなかった。(b) 培養 SCN アストロサイトにおいて同様の手法で GFAP の免疫蛍光染色したところ、発現が認められた。(c) 分化誘導後の SCN2.2-YC における MAP2 (赤) および GFAP (緑) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で測定し、得られたトレース。MAP2 の cDNA 増加がみられ、GFAP ではみられなかった。(d) 加えて二種類の Ca^{2+} 結合タンパク質、カルレチニンとカルビンディン-D28k、についても同様に mRNA 量を測定し、GAPDH の mRNA 量を基準として比較定量したところ、カルレチニンのみ発現が認められた。(e) の MAP2 および GFAP についても同様に比較定量したところ、MAP2 の発現量が有意に多いことが示された。 ** $P < 0.01$ by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test。

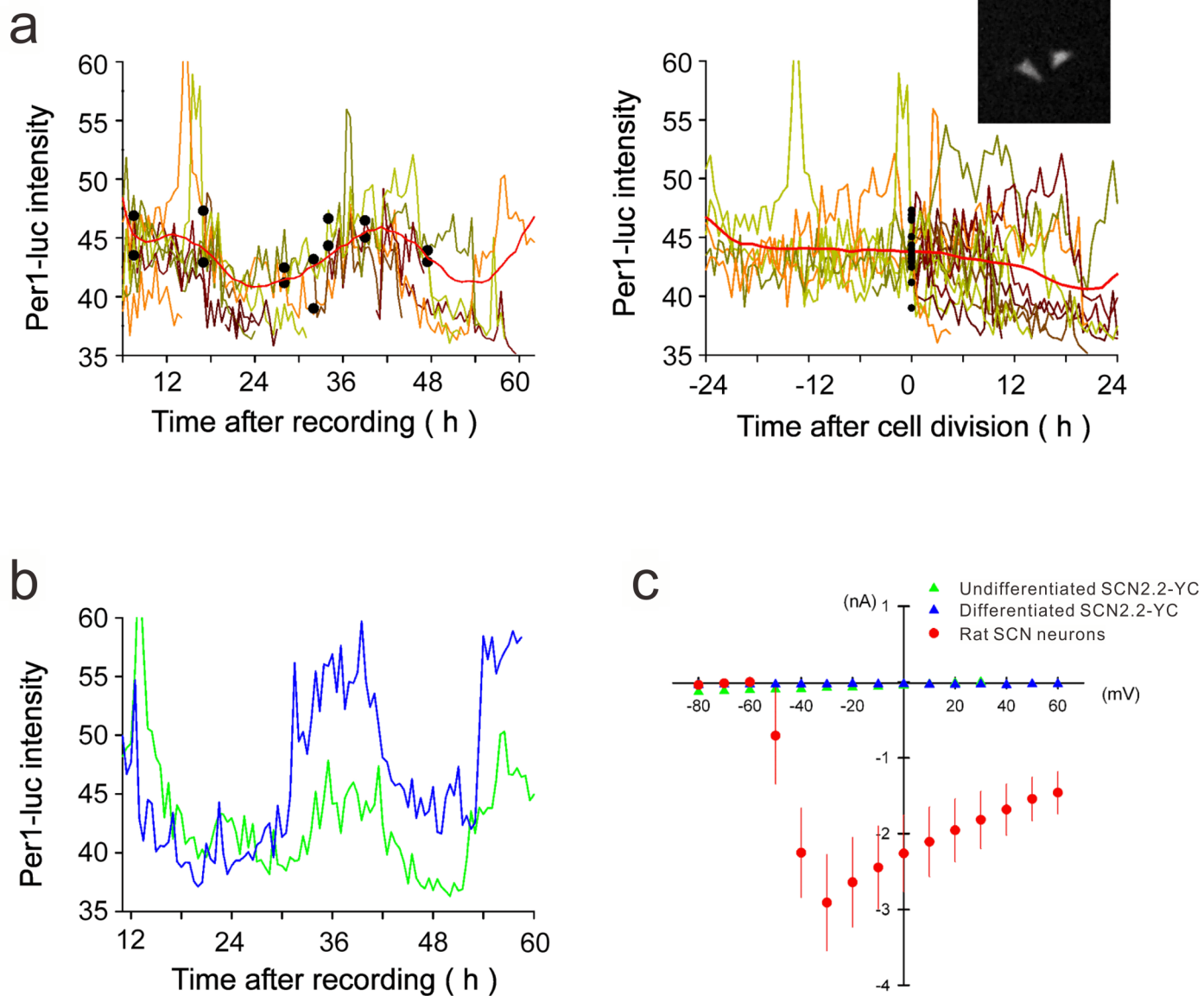


Figure 4

Figure 4. SCN2.2-YC 細胞における分子時計の存在と生理学的出力の欠損。

(a) *Per1*-ルシフェラーゼ化学発光イメージングによって SCN2.2YC 細胞における *Per1* 転写リズムを測定した。上の図は未分化 SCN2.2YC 細胞の概日リズムで、イメージングを開始したタイミングにあわせてトレースを並べている。下の図は細胞分裂のタイミングを基準として標本ごとのトレースを並べた場合の *Per1* 転写リズムをみている。異なる色のトレースはそれぞれ別の標本の結果を表し、赤のトレースは各トレースを平均化したものを表している。黒の点は細胞分裂した時点を表している。トレースを細胞分裂のタイミングに合わせ、各トレース平均化すると、*Per1* 転写リズムはみられなくなった。これは SCN2.2-YC 細胞の *Per1* 転写リズムは細胞分裂に依存しないことを示している。(b) SCN2.2-YC 細胞における *Per1* 転写リズムを未分化(緑)と分化誘導後(青)で比較したもの。分化誘導後の方が、振幅が大きい傾向があるが、未分化とリズムに違いがみられなかった。(c) ホールセルパッチクランプレコーディングによる電位依存性 Na⁺カレントの解析。ラット SCN ニューロン (赤)、未分化 SCN2.2YC 細胞 (緑)、4F 培地による分化後 SCN2.2-YC 細胞 (青) それぞれ 4-8 細胞を標的として電位依存性 Na⁺カレントを測定している。ラット SCN のニューロンのみが電位依存性 Na⁺カレントを示している。

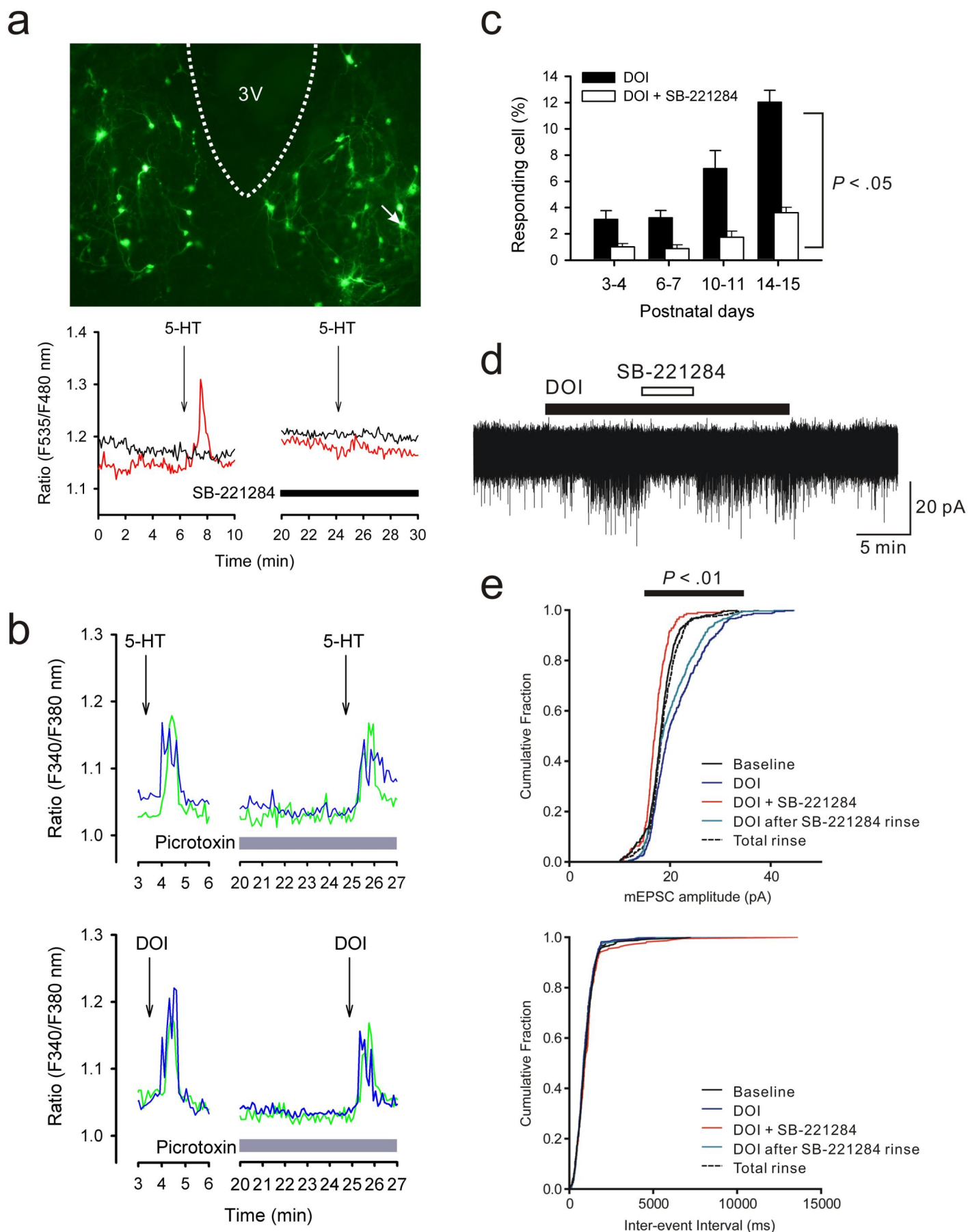


Figure 5

Figure 5. ラット SCN のポストシナプスにおける 5-HT 応答。

(a) 上の図は NSE プロモーターを発現しているラット SCN スライスの免疫蛍光画像。下の図は SCN ニューロンにおける 5-HT 誘導性 Ca^{2+} 濃度増加応答の測定結果。黒矢印は $3\ \mu\text{M}$ 5-HT 刺激のタイミングを表している。刺激時間は 45 秒間とした。赤と黒の波形は別々のニューロンにおける細胞内 Ca^{2+} レベルを示している。5-HT 誘導性 Ca^{2+} 濃度増加応答を示したニューロン (赤) は上の図の白矢印の指す SCN の腹外側に位置していた。5-HT 誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答は 5-HT_{2B/2C} 受容体アンタゴニストである $300\ \text{nM}$ SB-221284 によって抑制された。(b) ラットから作製した急性脳スライスを用いて Fura-2 染色により細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答を測定した。この実験では二回目の 5-HT 刺激を GABA-A 受容体アンタゴニストである $50\ \mu\text{M}$ ピクロトキシン存在下で行った。5-HT および 5-HT_{2A/2C} 受容体アゴニストの $1\ \mu\text{M}$ DOI 誘導性の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答に対するピクロトキシンの影響は小さく、ピクロトキシン非存在下における刺激時と同程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答がみられた。(c) DOI 誘導性の Ca^{2+} 応答は出生後発生の段階で増加し、また $300\ \text{nM}$ SB221284 で抑制された ($P < 0.05$ by two-way ANOVA)。各々の試験に 8-12 スライスを用いた。(b) と (c) の測定は $0.5\ \mu\text{M}$ TTX 含有 ACSF をかん流させて実施した。(d) $1\ \mu\text{M}$ DOI 刺激を無処理および $500\ \text{nM}$ SB221284 存在下でそれぞれ行った際の EPSC をボルテージクランプによって測定した。(e) EPSC の振幅は DOI 刺激によって有意に増加した ($P < 0.01$ by two-way ANOVA)。これらの結果は 5-HT_{2C} 受容体が SCN のポストシナプスにおいて発現していることを示している。

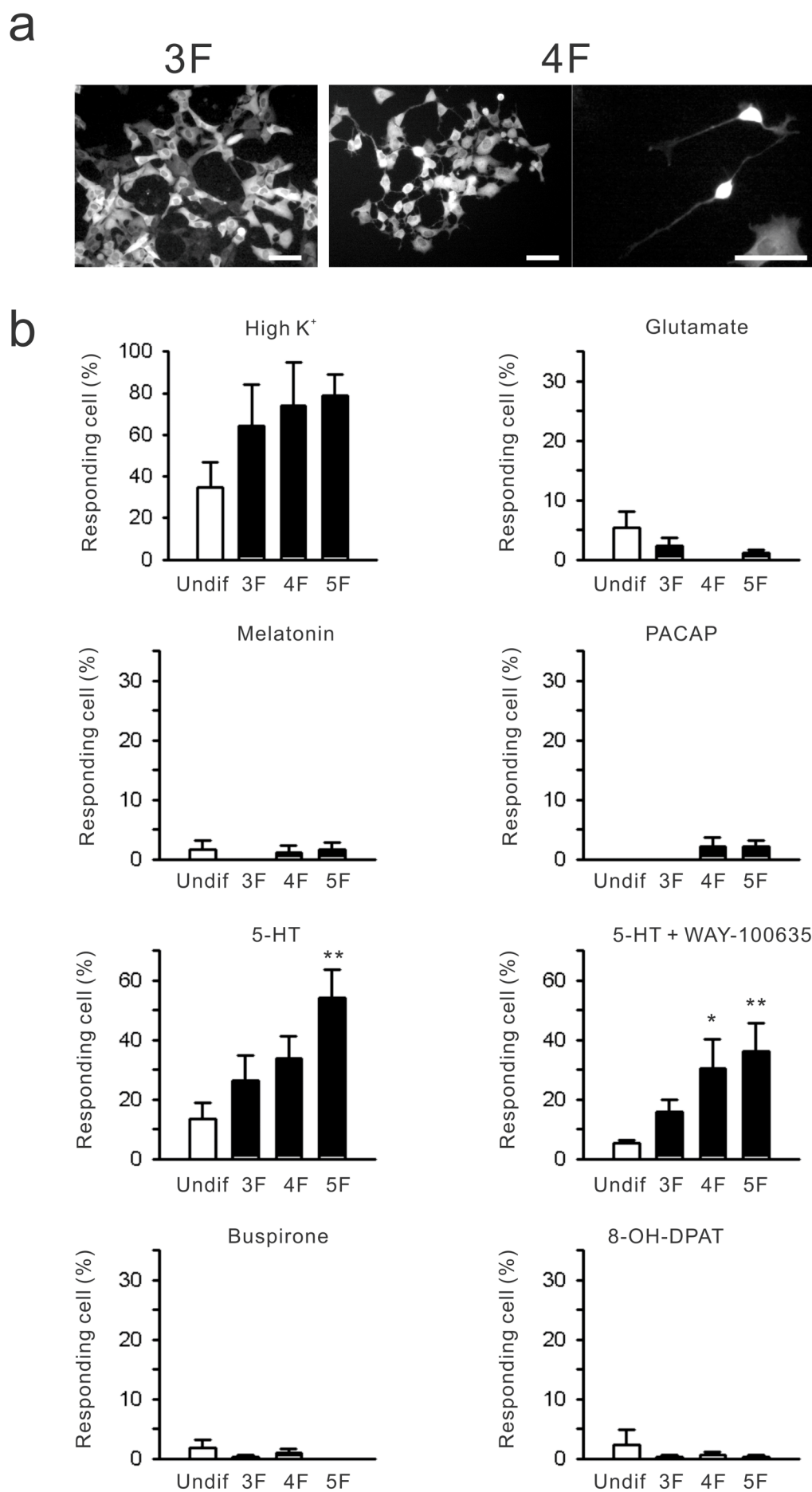


Figure 6

Figure 6. 培養条件の異なる SCN2.2-YC 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答。

(a) 左は 3F 培地で培養した SCN2.2-YC の蛍光画像。中央は 4F 培地で培養した場合の蛍光画像。右は中央の画像の拡大図。4F 培地を用いることでより顕著な形態変化がみられるようになり、よりニューロンに近い形態となった。(b) 様々な刺激に対して細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答を示した細胞の割合を培養条件ごとに比較した。High K^+ 刺激に対して約 35% の細胞が応答したが、5F 培地で分化誘導することによって約 2 倍の細胞が応答するようになった。一方で 1 mM グルタミン酸、1 μM メラトニン、100 nM PACAP に対してはほとんどあるいはまったく応答しなかった。3 μM 5-HT 刺激に関しては、培養条件を変えることによって応答細胞の割合が変化し、5F 培地で培養した場合が最も多くの細胞が応答した。また、5-HT 刺激による Ca^{2+} 応答は 100 nM WAY100635 の影響を受けず。10 μM ブスピロン、1 μM 8-OH-DPAT に対しては Ca^{2+} 応答を示さなかった (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by one-way ANOVA)。各グループ 6-12 サンプルで測定。

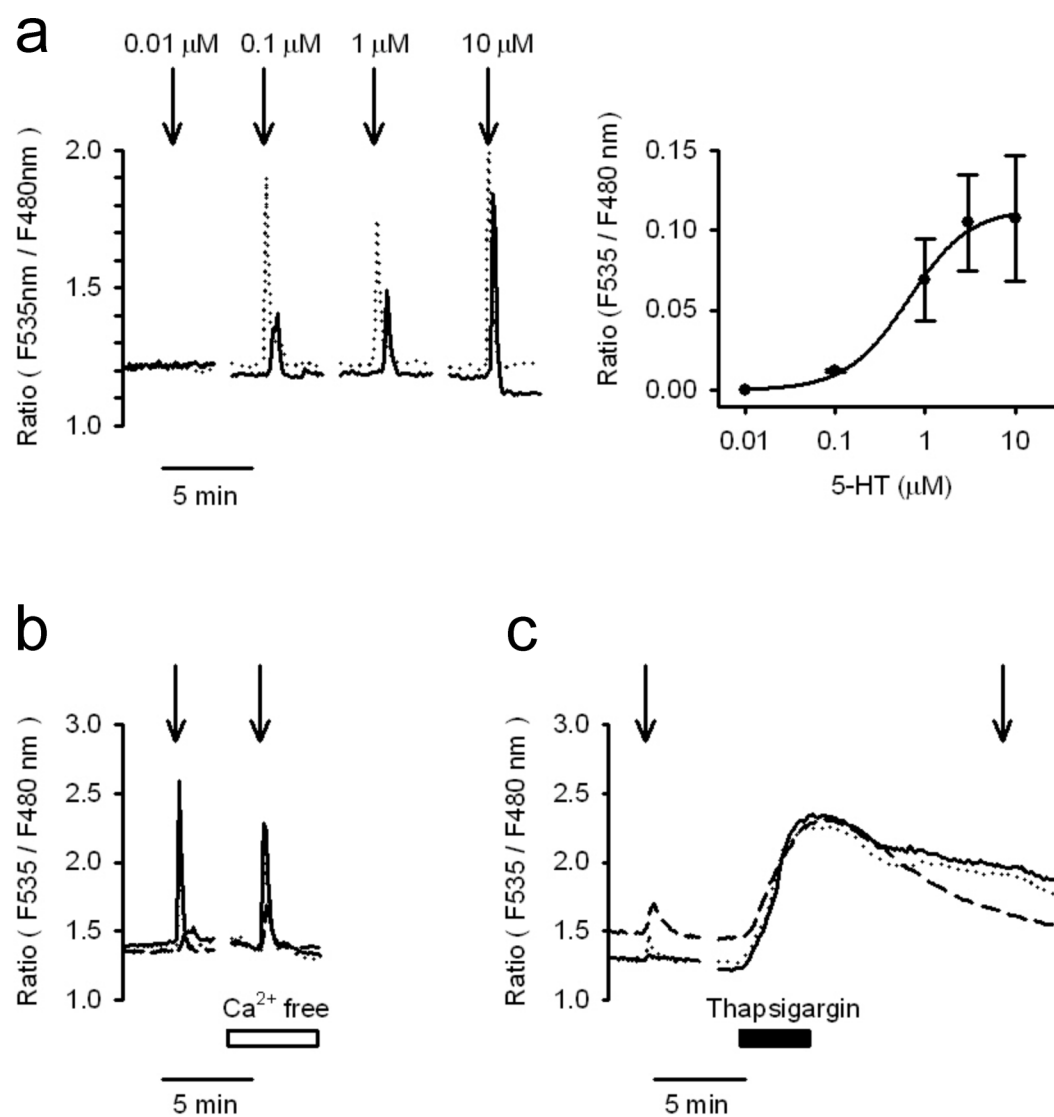


Figure 7

Figure 7. 5F 培地で分化誘導した SCN2.2-YC 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答の性質。

(a) 左は様々な濃度で繰り返し SCN2.2-YC 細胞を刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答の振幅。分化誘導後 SCN2.2-YC 細胞において 5-HT の濃度依存性がみられた。右は SCN2.2-YC 細胞の 5-HT に対する濃度依存性を濃度依存曲線で表している。(b) $1\ \mu\text{M}$ 5-HT で 45 秒間刺激した際の Ca^{2+} 応答は細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0 にすることで阻害された。(c) 一方でサプシガルジン ($1\ \mu\text{M}$) により Ca^{2+} の細胞内貯蔵を空にした後では 5-HT 応答は消失した。別のディッシュで培養した SCN2.2-YC 細胞を用いて計 3 回、50 細胞で観察したが結果は同様であった。

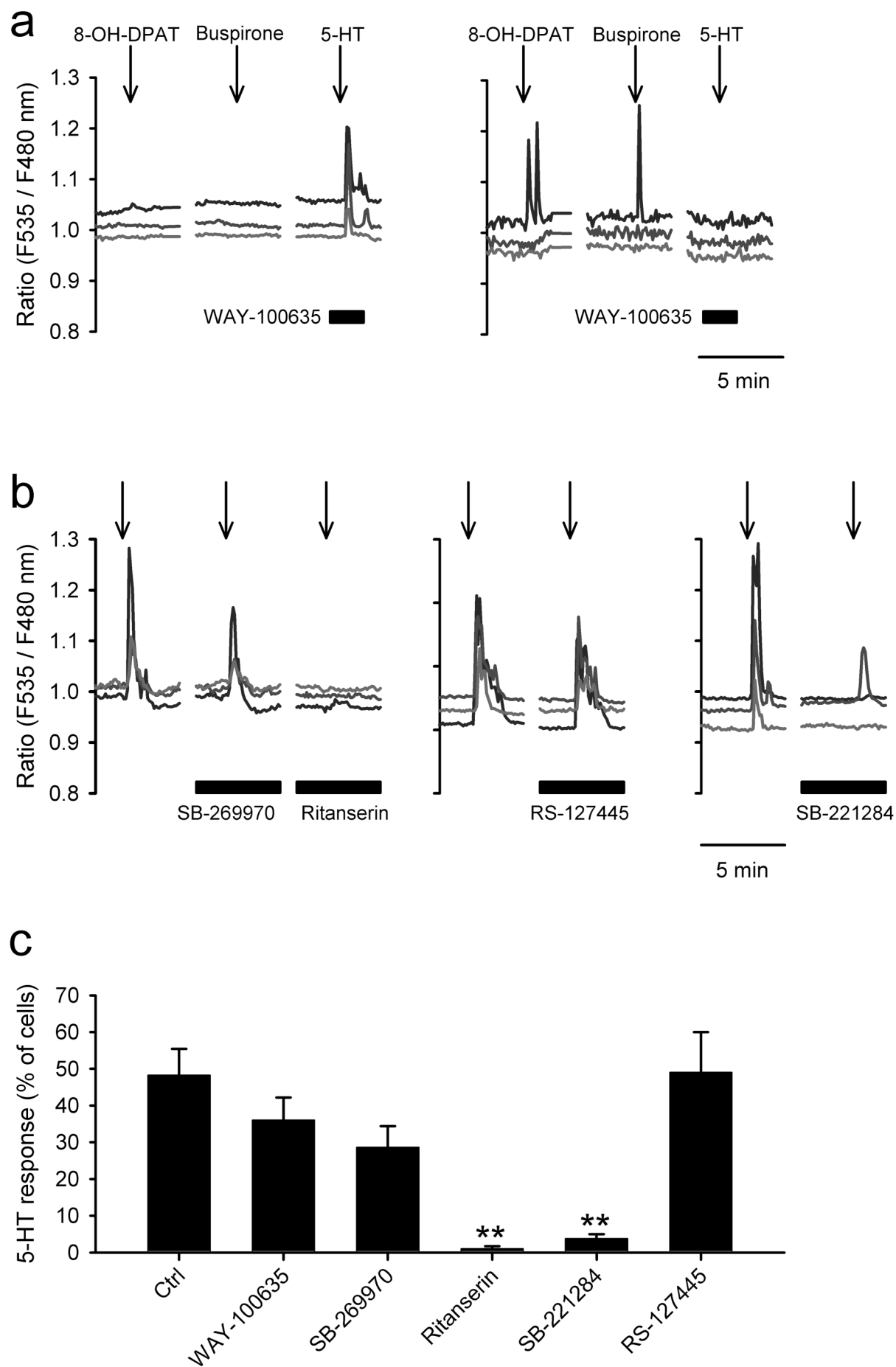


Figure 8

Figure 8. 5F 培地で分化誘導した SCN2.2-YC 細胞の 5-HT 誘導性 Ca^{2+} 変動の阻害。

(a) SCN2.2-YC 細胞を 1 μM 8-OH-DPAT、10 μM ブスピロンで 45 秒間刺激、あるいは 100 nM WAY100635 存在下で 5-HT で 45 秒間刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加応答。左は 8-OH-DPAT とブスピロンでは応答を示さず、WAY100635 存在下でも 5-HT 誘導性 Ca^{2+} 応答が観察された結果。右は逆に 8-OH-DPAT とブスピロンに対して Ca^{2+} 応答を示し、WAY100635 存在下での 5-HT 誘導性 Ca^{2+} 応答がみられなかった結果。(b) 20 分間隔で細胞に 1 μM 5-HT 刺激を 2-3 度繰り返し、2 回目と 3 回目を 30 nM SB269970、30 nM リタンセリン、100 nM RS-127445、100 nM SB-221284 をそれぞれかん流した状態で刺激した。これらのうちリタンセリンと SB-221284 によって、有意に Ca^{2+} 応答が抑制された。(c) それぞれの条件で 13-20 回試験し、平均値を算出した。 ** $P < 0.01$ (コントロールと比較して) by Duncan's multiple range tests following one-way ANOVA。

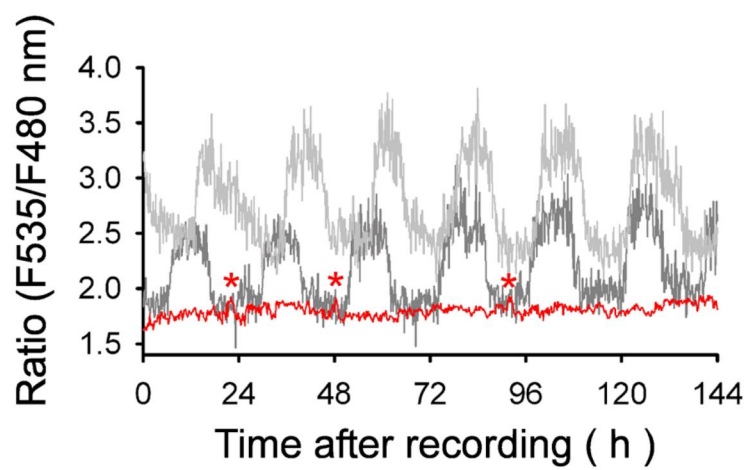
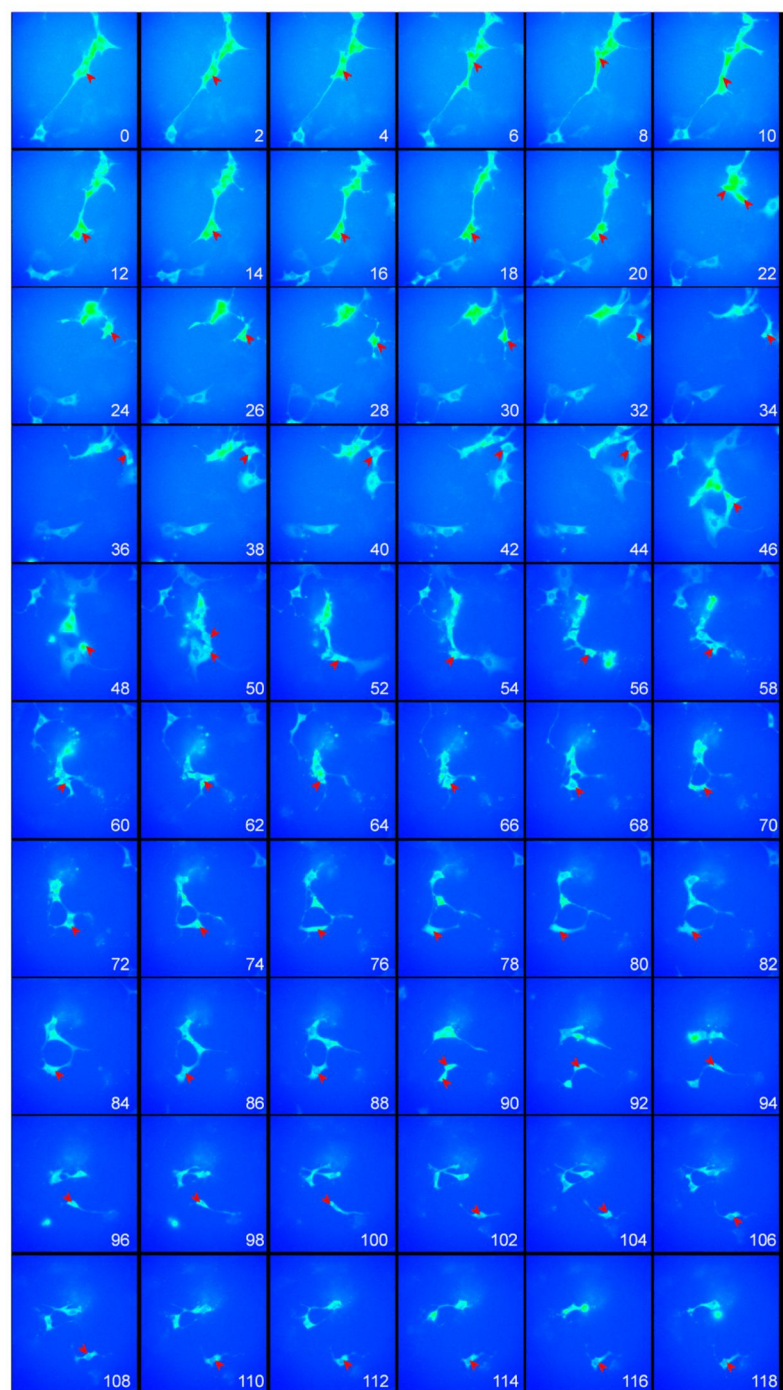


Figure 9

Figure 9. SCN2.2-YC 細胞における長期の YC3.6 イメージング。レコーディング中の細胞培養には 4F 培地を用い、2 時間間隔で蛍光画像を撮影した。赤の矢じりは 6 日間追跡に成功した細胞を指している。SCN2.2-YC 細胞における細胞内 Ca^{2+} レベル変動は下の図の赤いトレース、細胞分裂したポイントを赤のアスタリスクで表している。二本の灰色のトレースはポジティブコントロールであるラット SCN ニューロンの測定結果を表している。SCN2.2-YC 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度に概日振動はみられなかった。