

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15426

研究課題名(和文) ミクログリア活性化に対する光療法の開発—動物モデルを用いた基礎的研究—

研究課題名(英文) Effect of repetitive and transcranial near infrared irradiation on inflammatory processes in the brain of rats.

研究代表者

高橋 太郎 (Takahashi, Taro)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30402358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外線を持つ抗炎症作用に注目し、精神疾患における活性ミクログリア仮説に対する治療法発見のため、近赤外線の脳内効果を調査した。当初予定した活性ミクログリア仮説に即したPoly:I:C及び、GM-CSFの擬似感染モデルでは、ラットの脳内で有意なミクログリア活性化がみられなかった。一方、近赤外線の脳への効果は、健常ラットに近赤外線を照射した場合には、照射ラットでは、非照射ラットに比べBDNFの増加、インターロイキン(1、6、及び10)の減少、照射後の体温上昇がみられた。特にBDNFは、成体に加え、胎児期ラットやヒト培養神経細胞でも照射後の上昇がみられ、精神疾患の予防法につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Immune activation processes including microglial activation in the brain have been implicated in the pathology of neurodevelopmental disorders such as schizophrenia and autism. Low-level laser therapy (LLLT) has been used in the treatment of inflammatory pathologies. In this study we examined possible therapeutic effects of LLLT on immune activations in the rat brain of offspring of dams exposed to poly I:C and GM-CSF. The immune activation in the rat brain wasn't shown between poly I:C, GM-CSF and control group. However, the expression levels of BDNF were shown to increase while several cytokine (IL-1, IL-6, IL-10) were shown to decrease after LLLT on the normal rat frontal cortex by using RT-PCR. Similarly the rat body temperature tended to elevated after LLLT. Especially activation of BDNF expression by LLLT was shown in rat pup brain and human neuroblastoma cell (SK-N-SH). The result suggests LLLT may affect brain function through modulation of expression BDNF and cytokine.

研究分野：神経行動学

キーワード：Low level Laser therapy BDNF インターロイキン

## 1. 研究開始当初の背景

近年急速に進展した脳画像研究によりアルツハイマー病等の神経変性疾患だけでなく、精神疾患に分類される統合失調症でも脳の特定部位の委縮が薬物治療開始前から存在することや、病態の進行に伴ない脳萎縮が拡大することが明らかとなってきた。統合失調症における脳萎縮の原因は未だ不明であるが脳内炎症を介した神経免疫系の関与が示唆されており、我々は positron emission tomography (PET) 研究により、未治療統合失調症患者が健常者と比べて、ミクログリアの活性化が脳全体で有意に増加していることを明らかとした。これらの結果よりミクログリアの活性化が統合失調症の病態生理・精神病症状形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。そのためこのミクログリアの活性化を抑制することが、統合失調症の病態改善に重要な役割を担うと考え、近年頭部外傷による炎症やミクログリアを抑制すると報告されている頭部への近赤外線を用いた Low level laser therapy (LLLT) に注目した。

そのため今回我々は精神疾患動物モデルとして胎生期疑似感染モデルである胎児期ラットへの polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid (Poly I:C) 投与モデルを用い、同モデルラットにおいてミクログリアが活性化しているかを検討し、LLLT によってミクログリアへの影響があるかどうかの研究計画を立案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述した Poly I:C 投与による胎生期疑似感染モデルを用い、同モデルにおいて、臨床データと同様にミクログリアが活性化しているかどうかを明らかにし、そのモデルに対して LLLT の効果が認められるかどうかを検証することが目的である。まずは胎児期ラット Poly I:C 投与モデルの統合失調症モデルとしての表面妥当性を検討するため

脳組織におけるミクログリアマーカーとして、iba-1 を用いてミクログリアの数及び、形態の変化を検討した後、そのモデルを用いて LLLT における IL-6、IL - 10 などのサイトカインや BDNF の発現変動から脳内における LLLT の効果を検討する。

以上より、胎児期のウィルス感染が統合失調症の危険因子であるかどうかの妥当性を証明し、発症メカニズムの解明につながると考えている。加えて疾患モデルへの LLLT の検討は、本研究の最終目的である統合失調症を含めた精神疾患への新たな予防法・治療法を創出することにつながると考えられる。

## 3. 研究の方法

胎生期疑似感染モデル作製方法：Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット妊娠 13 日目に Poly I:C を 20 mg/kg で腹腔内投与して疑似感染を惹起させ、その後自然分娩させた。3 週齢で離乳し、その後一定期間飼育し 4、8 週齢になった時点で還流固定を行った。対照群としては妊娠 13 日目に PBS を腹腔内投与した。

### ➤ 胎生期疑似感染モデルでのミクログリアの形態観察

また、胎生期疑似感染モデルモデルの比較対象として、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) も使用した胎児期疑似感染モデルでも同様の検討を実施した。麻酔下で還流固定し、凍結脳連続切片を作成、切片にミクログリアの標識のため Iba1 認識抗体を用いて免疫染色を行い、ミクログリアの総数や形態変化の検討を行った。

### ➤ LLLT における適応条件の検討

胎生期疑似感染モデルへの LLLT の実施に際し、8 週齢の健常ラットを LLLT の照射条件を検討するために使用した。照射にはスーパーライザー HA-30 (東京医研社製：承認番号：1B-863) を用いて行った (図 1A)。また、

近赤外光の照射条件は、出力、照射時間、照射面積によって算出される光エネルギー密度 ( $J/cm^2$ ) を用いて条件設定がなされるため、出力 100%、照射時間 (on:5 秒/off:2 秒) の 30 秒 ~ 490 秒、照射面積  $0.8cm^2$  として  $0.81\mu m$  の波長により  $45\sim 720J/cm^2$  の範囲で近赤外光の照射を行った。対象群は、光を当てず器具を当てるのみとした。LLLT 処置については、前日に剃髪し、当日は麻酔下にて照射した (図 1B)。LLLT 処置 3 時間後に麻酔下で断頭し medial prefrontal cortex (mPFC) をサンプリングした。これらのサンプルより TRIZOL reagent (Invitrogen LT.) を使用して mRNA を抽出し、SuperScript (Invitrogen LT.) により cDNA を合成した。各遺伝子の発現は ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用し real-time qPCR を行った。

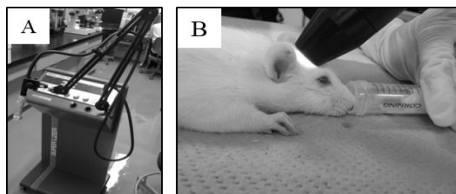


図 1 ; スーパーライザー及びラット頭部への照射

また、早期の近赤外線の効果も検討するため 5 日齢のラットを各 6 匹からサンプリングした嗅球と小脳を除いた脳サンプルを protein lysis buffer に溶解させタンパク質サンプルを調整した。これらのサンプルを用いウエスタンブロッティング法により BDNF タンパク質の発現量を検討した。

#### 4 . 研究成果

・ Poly I:C 及び GM-CSF を用いた擬似感染モデルでのミクログリアの形態変化の観察

胎生期感染モデルである Poly I:C 投与モデルの仔が 4、8 週齢でのミクログリアの発現局在または細胞形態を大脳皮質で検討した。その結果、4、8 週齢における IBA-1 活性化細胞の総数は PBS コントロール群に比べて差

は認められなかった (図 2A)。同様に形態についても PBS コントロール群 (図 2B-e, f, k, 及び l) に比べ目立った変化はみとめられなかった (図 2B-a, b, g 及び h)。Poly I:C を用いた胎生期感染モデルの検討ではミクログリアが活性化しているような形態変化は認められなかった。そこで、マウスにおいて統合失調症モデルの有力なひとつとして考えられている、乳児期疑似感染モデルである GM-CSF モデルを作成し仔が 4 週齢もしくは 8 週齢になった時点でミクログリアの総数と形態を大脳皮質で検討した。その結果、Poly I:C 投与モデルと同様に 4 週と 8 週齢の大脳皮質において PBS コントロール群に比べミクログリアの数や形態に変化が認められなかった (図 2A と図 2B-c, d, I 及び k)。

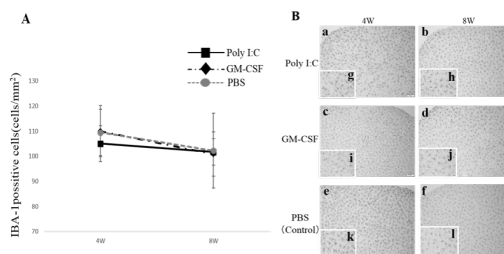


図 2 ; 幼若期擬感染モデルによる、4 及び 8 週齢における IBA-1 活性化細胞の数と形態

#### ・ 近赤外線 LLLT による脳内変化の検討

両者のミクログリア活性モデルにおいて有用な活性化が認められなかったが、健常成体ラットを用いた近赤外線照射による LLLT の効果検討のための脳へ近赤外線照射の効果については、照射群における BDNF が有意ではないものの、非照射群に比べ容量依存的に増加し、一方インターロイキン (IL-1、IL-6 及び IL-10) では減少が認められた (図 3A, B, C 及び D)。

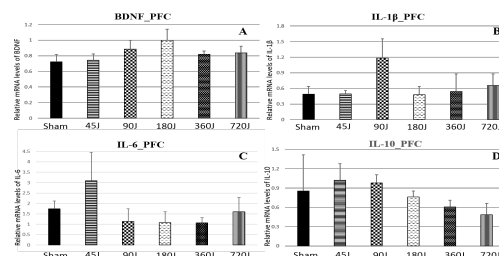


図 3 : LLLT による脳内 mRNA 発現量の変化

さらに照射後のラットの体温についても照射群において、照射後の常用が認められた(図4)。

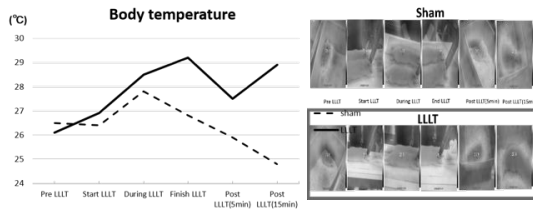


図4: LLLT 前後のラット体温の変化

また、乳児期ラットに対する照射による BDNF への変化についても、20J/cm の照射群において非照射群よりも有意に BDNF が増加し(図5A)、30J でも差はみられなかったものの、増加傾向が認められた(図5B)。

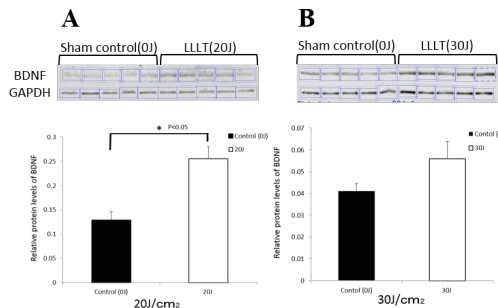


図5: 乳児期 LLLT 照射による、脳内 BDNF の変化

さらに近赤外線照射による BDNF 増加傾向は、ヒト培養神経細胞 (SK-N-SH) に近赤外線を 5J - 40J/cm の範囲で照射したところ、20J の照射条件で、近赤外線照射を行った細胞内での BDNF 発現量が、照射を行わなかった細胞に比べ有意に増加が認められた(図6)。

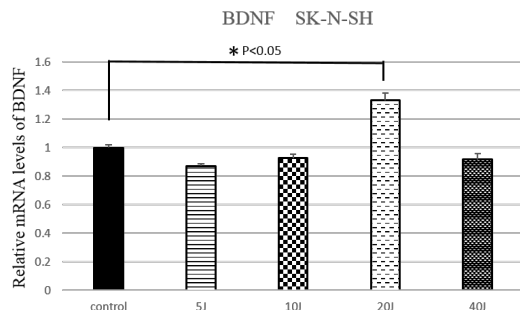


図6: ヒトニューロン培養細胞 (SK-N-SH) に対する LLLT による BDNF mRNA の変化

上記のように、今回の検討では胎生期疑似感染モデルである poly I:C モデルにおいて大

脳皮質におけるミクログリアの活性化は認められなかった。同様に乳児期疑似感染モデルである GM-CSF モデルでも大脳皮質のミクログリアの総数及び形態変化はみられなかった。このことについては、ラットとマウスの種差や投与濃度、投与タイミングなどの実験阻害要因や実験設定において胎生期や乳児期感染後のストレス負荷の有無など活性化モデルにおいては様々な要因が考えられる。幼若期疑似感染による統合失調症動物モデルのメカニズムはまだわかっておらず、例えば統合失調症患者で確認されている、成長後にみられるミクログリアの活性化メカニズムを明らかにするためにはより今後も詳細な検討が必要である。一方で、LLLT による頭部近赤外線照射によって、成体ラットの脳内 BDNF、IL - 6、IL - 10 の発現や LLLT 照射に対する動物の体温などに興味深い変化が認められた、特に BDNF は、成体に限らず、乳児期ラットの脳内やヒト培養細胞においても、照射条件によって有意な増加がみとめられた。このことは、種を超えて、LLLT が普遍的な効果を持つことが考えられる。BDNF は、うつ病や認知症への改善因子としても注目されており、今回の LLLT による BDNF 増加は、新たな精神疾患の治療法になり得る可能性を示唆している。今後はメカニズムにおけるより詳細な検討が必要と考えられる。

## 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2件)

1. Wakuda T, Iwata K, Iwata Y, Anitha A, Takahashi T, Yamada K, Vasu MM, Matsuzaki H, Suzuki K, Mori N\*: Perinatal asphyxia alters neuregulin-1 and COMT gene expression in the medial prefrontal cortex in rats. Prog Neuropsychopharmacol

Biol Psychiatry. Jan 2; 56: 149-54. 2015

2. Mundalil Vasu M, Anitha A, Takahashi T,  
Thanseem I, Iwata K, Asakawa T, Suzuki  
K\* : Fluoxetine Increases the Expression of  
miR-572 and miR-663a in Human  
Neuroblastoma Cell Lines. PLoS ONE: Oct  
7; 11(10): e0164425, 2016.

〔学会発表〕(計1件)

●ポスター発表

高橋太郎, 山田浩平, 鈴木勝昭, マヘツシュ  
M.V, 森則夫 : Effect of the near-infrared  
wavelengths irradiation on rat brain.

-Basic study of phototherapy by animal  
model-第58回日本神経化学大会,平成27年

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 太郎 (Takahashi, Taro)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 30402358