

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430068

研究課題名(和文) 線虫をモデルとした光刺激と寿命・老化制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of lifespan and aging by exposing LED light in *C. elegans*

研究代表者

原田 真市 (Shin-ichi, Harada)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90272955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：LED光源の中でも、特に青色LEDに着目し線虫の寿命に与える影響について検討した。青色LEDにより線虫の寿命は有意に短くなった。さらに青色LED曝露による線虫の活性酸素種を測定したところ僅かではあるが酵素活性の上昇が認められた。遺伝子発現解析からは、触覚神経で発現するmec-5遺伝子や神経系カルシウムセンサーとして機能すると考えられるncs-1遺伝子の発現が有意に増減していた。また線虫の行動解析からはコントロールに比べ青色LED照射により行動距離が短くなった。以上のことから線虫では青色LED曝露により酸化ストレスが上昇し、行動が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the biological disadvantage of blue LED light, we used the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, as a model. By exposing blue LED light at 465nm, the lifespan of *C. elegans* was decreased, and these reactive oxygen species (ROS) activity as a marker of stress response were slightly increased. Using Real-Time RT-PCR analysis to measure gene expression levels by exposure of LED light, we found that mec-5 gene which express in sensory neuron was highly expressed and neural calcium sensor (ncs-1) gene was significantly decreased in worms with blue LED light as compared to dark exposure as a control. Furthermore, we found to cause a marked deterioration in the worm's behavior with blue LED light. It is concluded that exposure of blue LED light may cause oxidative stress, and result in abnormal locomotion and survival in the nematode *C. elegans*. However, further investigation is required to clarify the toxicological effect of the LEDs light.

研究分野：分子生物学

キーワード：C. elegans LED light

1. 研究開始当初の背景

照明器具は、省エネルギーの観点から白熱灯や蛍光灯から LED 照明にシフトしつつある。また高出力 LED 光源を用いた様々な分野への応用がなされている。特に医療分野位においては、LED 光源を使い光線力学治療 (PDT) によるがん治療、肥大した脂肪塊セルライトの除去、歯茎の健康促進や歯周病の予防に効果があると謳われ、実際治療現場でも使用されている。また、社会心理学分野では、青色 LED 照明を街灯に設置することにより犯罪の抑止に一定の効果を見出し、さらには駅ホームからの飛び込み自殺者の減少、夜間のドライバーに対して LED 信号が注意力を向上させるなどの効果が認められている。

その一方で、波長の異なる LED 光源による様々な危険性が問題視されているのも事実である。視覚ストレスであるフリッカーリング、網膜への熱ストレス、青色ストレスがその一例である。青色ストレスはメラニン分泌を抑制させ、発ガンとの関連性や網膜障害との関連性が指摘されている。

また街灯に LED 照明が採用されることで都市部に住む鳥の体内時計 (サーカディアンリズム) を狂わせ食性にも影響があること、さらにはホタルの幼虫が LED 照明により忌避行動をとることなどが報告され、人工光源が人間界だけでなく生物界における様々な影響が危惧されておりその生体への影響に世界中で関心が集まっている。

紫外線のように DNA の損傷や免疫抑制といった報告はないが、今後エネルギー供給量の減少に伴い、従来の光源からよりエネルギー変換効率の良い LED 光源へとシフトすることは明らかであるが、しかし、その反面未だ医学的な安全性が保証されたわけではない。従ってその安全性措置として LED 光源による生物学的影響の解明が急務となる。

2. 研究の目的

本研究では線虫 *C. elegans* を用い、LED 光源照射による刺激から惹起される様々な生物学的影響を分子生物学的手法により明らかにすることを目的とする。

LED 光源に起因する危険性については前述の通りでありその報告数も増加傾向にあるが、それらが生体に与える影響の作用機序の十分な解明には至っていない。そこで我々は、モデル動物の線虫 *C. elegans* から光照射による様々な表現型から新たな遺伝子カスケードを明らかにし、LED 光源環境下での安全・有効性及び傷害について検討することで遺伝子の光制御による医療への応用を模索したいと考えた。

近年、Optogenetics と呼ばれる光遺伝学的手法を用いた研究が盛んである。この手法は、本来神経回路機能を調べるために光学と遺伝学を融合し、神経系高次機能に置ける情報

処理を理解することが目的である。光活性化分子のチャンネルロドプシン 2、またはハロロドプシンを特定の神経細胞で発現させ、光刺激により興奮、または抑制シメージング技術を併用することで細胞内の現象の時・空間的解析に用いられてきた。しかしながら、Optogenetics に代表される LED 光源を用いた研究は益々増えつつあると言えるが、その波長の異なる光源下での生体影響、特に「光」と「老化」・「寿命」に着目した遺伝子レベルの解析はほとんどなく今後大きく注目されることが期待される。

モデル動物としての線虫 *C. elegans* は遺伝学的基盤が確立されており、全ゲノム配列、全細胞数 1,031 個からなる細胞系譜が明らかにされている。また、302 個からなる神経系の全構造も明らかになっており遺伝子の構造と機能の関連を *in vivo* で容易に解析が可能である。さらに、線虫 *C. elegans* をモデルとしたヒト疾患遺伝子の解析が非常によく行われており、LED 光源曝露による疾患モデルへの影響や変異体解析から細胞内メカニズムを理解することに貢献できると考えられる。

結果として、線虫 *C. elegans* での各種研究結果を *in vitro* 培養細胞系やより高等な齧歯類モデル動物に適用することで新たな遺伝子カスケードの発見に繋がるだけでなく、様々な障害、例えば脳血管障害やガンの治療法、診断バイオマーカー、そして治療・検査薬の開発に貢献できるものである。

そして、我々が網膜や皮膚細胞から取り込む「光」を人為的にコントロールすることで神経系における記憶の定着、行動のリモートコントロールや傷害治癒へと発展させられることが期待され、実際、線虫 *C. elegans* において光刺激による神経活動をコントロールする試みがなされている。

3. 研究の方法

(1) LED 光源による照射条件の最適化

用いた LED 光源は、中心波長 465nm、517.5nm、660nm、730nm と白色光の 5 種波長で行った。それぞれの光源の出力は最大 3W で、計 16 個の LED 電球を備えており個別のコントローラーで出力の調整と照射時間を制御している。

線虫を寒天培地上に放ち、寒天表面から光源までの距離を 20cm に保つため 6cm のプラスチックシャーレには 10ml の寒天培地を加えた。LED 光源照射時のインキュベーター内の温度は 20 とし、寒天培地内の温度は非接触型赤外線温度計を使用し計測した。

(2) LED 光源照射による線虫 *C. elegans* の寿命解析

各波長 LED 光源照射による線虫の寿命の測定には同調培養した線虫を用いた。同調培養は、成虫を多く含む寒天培地から線虫を回

収し、その後次亜塩素酸処理することで成虫を溶かし体内の卵だけを取り出す。数回洗浄したのち卵を寒天培地上におき、20 で飼育し、約 46 時間後の成虫を各シャーレに 10 匹ずつ入れ LED 光源下での寿命測定を行なった。

(3) LED 光源曝露による活性酸素種の測定

LED の照射により、生体あるいは細胞はストレスに反応し、様々なストレス因子を産生することが予想される。

48 時間 LED 光源曝露した線虫を回収し、ホモジナイズしたのち遠心し、移した上清に 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate を加えインキュベーションする。反応後、励起波長 485nm、検出波長 530nm にて Fluoroskan Ascent FL で蛍光強度を測定した。

(4) LED 光源が遺伝子発現に及ぼす影響

LED 光源曝露による遺伝子発現への影響を調べるため、まず包括的にその影響を DNA マイクロアレイ法により調べた。48 時間 LED 光源下で線虫を飼育し RNA を回収する。抽出した RNA は、その純度を確かめるため Bioanalyzer につけ RNA Integrity Number (RIN)により純度を分析した。RIN の値が >8 以上の RNA はほぼ分解がないとのことからマイクロアレイ解析に用いた。

また個々の遺伝子の発現解析には定量的 RT-PCR 法を用い Mx3000P 装置による増幅のち遺伝子発現量の定量を行なった。

(5) LED 光源曝露中の線虫 *C. elegans* の行動解析

用いた LED 照明装置では、照射中に線虫の行動をビデオモニタリングすることができない。そのため寒天培地上の線虫の行動軌跡を見る方法としてトラッキングアッセイを行なった。トラッキングアッセイは、30 分間青色 LED 光源を線虫に照射したのち、線虫を NaN₃ で麻酔し印画紙上に逆さにしたプラスチックシャーレに光をあてその軌跡を焼き付けた。

4. 研究成果

(1) LED 光源による線虫 *C. elegans* の寿命への影響

5 種の波長の LED 光源に加え、光源のない真っ暗な状態をコントロールとして、LED 光源が線虫の寿命に与える影響について調べた。用いた 5 種の波長のうち 730nm の波長域を持つ近赤外線 LED 光源、660nm の波長域を持つ赤色 LED 及び白色光では照射時間とともに寒天培地内部が熱せられプラスチックシャーレ蓋内壁に水滴が多数生じてしまった。これにより光の屈折が起きることで乱反射し光源のエネルギーが減少すると考え寿命測定に用いるのを中止した。また、緑色 LED(波長 520nm)では線虫 *C. elegans* の寿命に与える影響は見られなかった。

唯一影響が見られたのは 470nm の波長域を持つ青色 LED であったことから、以後の研究は青色 LED でのみ行うこととした。

図 1 に示すように青色 LED 光源を照射し続けた線虫野生株 N2 の寿命は、コントロールである暗闇に比べ平均寿命は顕著に減少した。

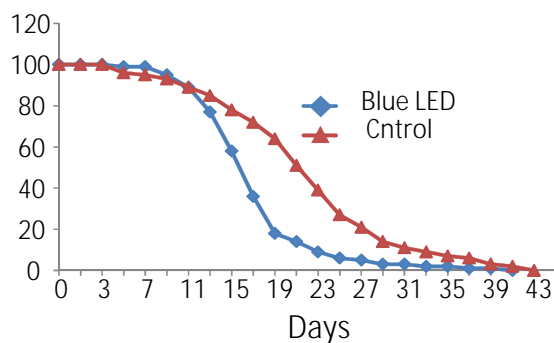


図 1. 青色 LED 光源照射による寿命への影響

(2) 青色 LED 照射による線虫 *C. elegans* の活性酸素種の比較

細胞は過度のストレスにより活性酸素種 (ROS; Reactive Oxygen Species) を産生することが知られている。青色 LED 光源の曝露が線虫にとってストレスになりうる可能性があることから、48 時間照射後の線虫を回収し ROS を測定した。図 2 にその結果を示す。

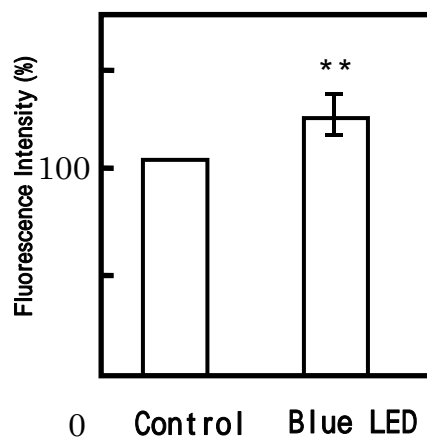


図 2. 青色 LED 光源照射による ROS 活性

青色 LED の照射により ROS 活性の指標である蛍光強度は約 25% 近く増加した。このことから青色 LED 光源は線虫にとって ROS 活性を上昇させストレス応答の要因になりうる。

(3) 青色 LED 照射による線虫 *C. elegans* の遺伝子発現に与える影響

青色 LED 光源曝露による線虫野生株 N2 の寿命が短くなり、その間ストレス因子である ROS 活性が上昇したことから、これら現象に關する遺伝子発現への影響を調べた。

まずマイクロアレイ解析により包括的に遺伝子発現を調べることでその原因となる候補遺伝子を抽出し、さらに候補遺伝子に対し定量的 RT-PCR 法で発現量を定量化した。

マイクロアレイ解析では非常に多くの遺伝子について発現量の差を知ることができ、影響のある遺伝子候補を絞り込むことができる。しかし、絶対的な定量法ではないため、選んだ遺伝子に対して RT-PCR 法による確認が必要とされる。

マイクロアレイ解析の結果、6 つ存在するタッチ受容体を構成する複合体の一つで細胞外タンパク質のコラーゲンをコードしている *mec-5* 遺伝子と神経系で機能し、主にカルシウムイオンのセンサー的役割を担う *ncs-1* 遺伝子に注目し、RT-PCR 法によりそれぞれの遺伝子の発現量を定量化した。遺伝子の内部コントロールとして線虫のアクチン遺伝子 (*act-1*) を用い、暗闇状態と青色 LED 光源曝露による遺伝子発現量を比較した。図 3(a) は、青色 LED 光源曝露あるなしの *mec-5* 遺伝子の相対的発現量を示す。青色 LED 光源曝露により *mec-5* 遺伝子の発現レベルは有意に上昇していた。逆に、青色 LED 光源曝露により感覚神経で発現する *ncs-1* 遺伝子の発現は図 3(b) に示す様に有意に減少していた。

このことはどちらの遺伝子も青色 LED に反応し遺伝子レベルでの発現にも影響を与えると考えられた。

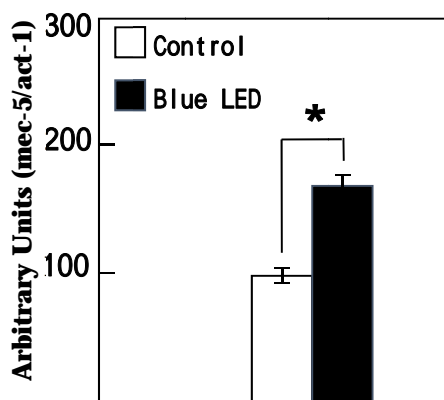


図 3. (a) Expression of *mec-5* mRNA

(*: $P < 0.001$, $N=3$)

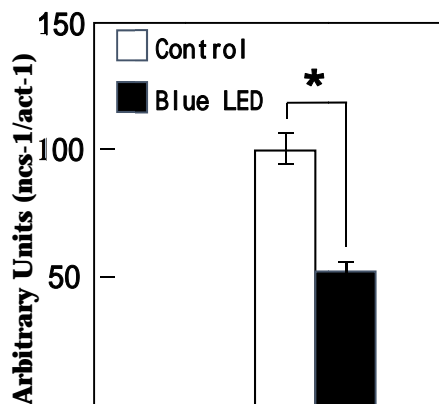


図 3. (b) Expression of *ncs-1* mRNA

(*: $P < 0.001$, $N=4$)

(4) 青色 LED 光源曝露による線虫 *C. elegans* の行動に与える影響

線虫をはじめ多くの生物には光刺激に対して忌避行動を示すことが知られている。青色 LED 光源を曝露している最中の線虫の行動をモニタリングするビデオシステムがないことから、線虫の行動した軌跡を記録する方法として一般的なトラッキングアッセイにより観察した。線虫の餌である大腸菌がない状態の寒天培地上に L4 期の幼虫一匹を放ち 30 分間青色 LED 光源に曝露させる。その後麻酔することで行動を止め印画紙に行動した軌跡を焼き付けた。

図 4 に青色 LED 光源曝露の有る無しの線虫の行動軌跡を示す。軌跡の定量化はできていないが、暗闇では線虫は餌を求め様々な方向へと移動するのに対して、青色 LED 光源を曝露した場合には、明らかに線虫の移動距離は減少しプラスチックシャーレの中心付近から離れたシャーレ縁に移動する傾向にあった。このことはシャーレ中心部での青色 LED 光源のエネルギーレベルが高いことからよりエネルギーレベルの下がる場所へ忌避していることが示唆される。

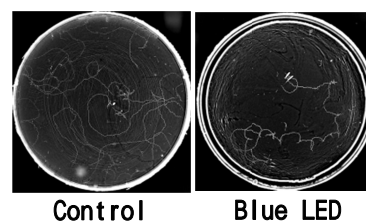


図 4. 青色 LED 光源曝露中の線虫 *C. elegans* の行動軌跡

(5) 青色 LED 光源による生体への影響

線虫 *C. elegans* の野生株である N2 に青色 LED 光源を曝露し、その影響について調べた。青色 LED により野生株 N2 の寿命は減少した。線虫 *C. elegans* には様々な変異体が単離されていることが知られている。その中で、寿命に関与する変異体がすでに明らかにされている。*daf-2* 変異体は野生株 N2 に比べ長寿となるが、その下流で機能すると考えられている *daf-16* 変異体は野生株 N2 よりも短命となる表現型を示すことが明らかにされている。都合上今回はデータを示してはいないが、両変異体ともに青色 LED 光源曝露ではもとの寿命に比べ減少する傾向であった。このことは、紫外線同様、青色 LED が持つ波長エネルギーには細胞障害を誘導すると考えられる。さらには、青色 LED 光源曝露により、線虫 *C. elegans* ミトコンドリア内で ROS 活性が誘導され酸化ストレスが増加したと考えられた。

それでは線虫 *C. elegans* はどのようにして青色 LED を感知し、その後の行動へと情報を伝達しているのか。詳細な検討は今後の課題であるが、図 3 に示したように、遺伝子発現において *mec-5* 遺伝子の発現が有意に増加

していることから、一つには線虫の表皮に存在するタッチ受容体が光を感知していると思われる。タッチ受容体は線虫の機械刺激応答に反応する感覚神経であるが、光のエネルギーにも反応していると思われる。光刺激によるタッチ受容体の活性化に伴いチャンネルが開き、Na⁺イオンの細胞外流出により神経活動が抑制されていると考えられる。また、もう一つには、カルシウムセンサーとして機能している *ncs-1* 遺伝子の発現が減少したことは、*ncs-1* 遺伝子が発現し温度センサーとしても機能している AFD 神経で青色 LED の波長を認識していると推測される。AFD 神経は温度感受性の感覚神経でもあり、感知した青色 LED 光源は線虫にとって細胞障害性があるとの認識から忌避行動をとろうとするが *ncs-1* 遺伝子の発現が低下したことで行動を制御する下流遺伝子へ影響を与え行動異常の表現型を示したと考えられる。

今後は、青色 LED 光源による生物学的影響の知見をより深く探るため RNAi を用いた遺伝子ノックアウトや、レーザーアブレーションによる特定に神経細胞破壊からの知見を合わせ光刺激に対する神経系の応答機構と細胞障害性の追求をしたい。

またマイクロアレイ解析により多数得られた光刺激応答遺伝子について、神経系だけでなく代謝関連への影響についても調べたい。そして、青色 LED だけでなく他の波長域の LED 光源による知見から LED のさらなる有効利用法を模索する。

<引用文献>

Bianchi L, Driscoll M. Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron* 2002; 34(3): 337-340.

Emtage L, Gu G, Hartweig E, and Chalfie M. Extracellular Proteins Organize the Mechanosensory Channel Complex in *C. elegans* Touch Receptor Neurons. *Neuron* 2004; 44(5): 795-807.

Gomez M, De Castro E, Guarin E, Sasakura H, Kuhara A, Mori I, Bartfai T, Bargmann CI, Nef P. Ca²⁺ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. 2001; 30(1): 241-248.

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 3件)

Nakayama A, Ninomiya I, Tsukada T, Okamoto K, Harada S, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Nakamura K, Oyama K, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, and Ohta T. Metformin inhibits the radiation-induced invasive phenotype of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2016; 49(5): 1890-1898.

Miyanaga S, Ninomiya I, Tsukada T, Okamoto K, Harada S, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Nakamura K, Oyama K, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, and Ohta T. Concentration-dependent radiosensitizing effect of docetaxel in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2016; 48(2):517-524.

Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Muneshige S, Harashima A, Harada S, Yamamoto H, and Ohta T. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer.* 2016; 419(4):1052-1065.

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 真市 (HARADA Shin-ichi)
金沢大学・医薬保健研究域・医学系
研究者番号：90272955