

眼への長期 UVA 照射はマウスの 記憶・学習能力低下に影響を及ぼす可能性がある

山手 百合香

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

研究報告

眼への長期 UVA 照射はマウスの 記憶・学習能力低下に影響を及ぼす可能性がある

山手 百合香

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： 紫外線, 長期眼照射, マウス, 記憶, 学習能力

要 旨

地球上に届く紫外線の種類には、長波長の A 波 (UVA) と短波長の B 波 (UVB) がある。近年、地球温暖化により紫外線照射量が増加しているため、生体への影響が懸念されている。地球への紫外線照射量のうち 9 割が UVA である。本研究では、UVA を長期間マウスの眼へ照射することで、記憶・学習能力と行動量にどのような影響が及ぼされるかを検討した。雄のヘアレスマウスを使用し、コントロール群 (紫外線照射なし)、皮膚のみ UVA 照射群、眼のみ UVA 照射群の 3 群に分けた。UVA は週 3 回 × 1 年間 (110 kJ/m^2 : FL20SBLB-A ランプ使用) 照射した。1 年後、マウスの記憶・学習能力はモリス式ウォーターメイズ (水迷路) テストを行い計測した。また、マウスの行動量はオープンフィールドテストを行い計測した。1 年後の結果では、行動量に 3 群間の有意な差はみられなかったが、モリス式ウォーターメイズテストでは、UVA 照射群のなかでも眼照射群で顕著にプラットホームまでの時間が低下した。このことから、マウスの長期 UVA 眼照射は、記憶・学習能力の低下を引き起こす可能性があると考えられた。この原因を解明するために、過去の研究でも変化が認められた脳内の活性酸素種 (reactive oxygens : ROS), Corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin 2, CRH と urocortin 2 の受容体である CRHR-1, CRHR-2 の発現を解析した。また、記憶・学習の低下に関与がある脳内の β アミロイド, Iba-1 (ミクログリアのマーカー) の発現も解析した。これらの項目のうち、CRHR-1 の発現のみ 3 群間に有意差はなかった。そのほかの項目では、3 群間のうち UVA 眼照射群が顕著に上昇した。このことから、ROS, urocortin 2, CRHR-2 がマウスの長期 UVA 眼照射による記憶・学習能力の低下に重要であると示唆された。そこで CRHR-2 アンタゴニスト (Antisauvagine-30), CRHR-2 アゴニスト (urocortin 2), また、ROS スカベンジャーを各々マウスに 1 年間 (週 3 回: 月・水・金/週), 脳室内投与し同様の試験を行った。

以上の結果から、長期 UVA 眼照射によるマウスの記憶・学習能力低下の可能性が示され、その要因に urocortin 2, CRHR-2 のほかに、ROS によるミクログリアの増加も関与していることが示唆された。

1. はじめに

紫外線 A 波 (UVA: ultraviolet A) は地上に届く紫外線の約 9 割を占め、生体に様々な影響を及ぼすことが知られている。長期 UVA 暴露について知られているのは光老化の問題である。例えば、皮膚の真皮にあるコラーゲンやエラスチンにダメージを与え、しわや乾燥を起こす。照射が長期間に及ぶと、皮膚がんにも関与する。また、照射後の細胞からは活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) が発生することは良く知られている¹⁾。しかし長期間の UVA 照射がマウスの記憶・学習能力や行動量にどのような変化をもたらすかは不明であるため着目した。とくに、UVA 照射を皮膚のみならず眼へおこなうことで、より脳への影響がもたらされるのではないかと考えた。これは、人間におきかえと常に衣服を着ている皮膚に比べ常に外界にさらされている眼への紫外線照射の影響は大きいのではないかと考えたからである。また、過去に、本研究者はマウスにおける長期 UVA 眼照射による脳の視床下部 - 下垂体を介した免疫系の変化を報告している²⁾。このように、皮膚以外の器官として眼への UVA 照射はマウスの生体に変化をもたらすことを経験した。今回の記憶・学習能力と行動量の変化の研究においても長期 UVA 照射を行う際に、マウスの皮膚または眼に各々照射し比較している。

紫外線を含む、様々な外的ストレスは生体の中枢である視床下部を刺激し、視床下部ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH: corticotropin-releasing hormone) の分泌を増加させる³⁾。この CRH の受容体 (CRHR: CRH receptor) にはサブタイプが 2 種類有り、CRHR-1 と CRHR-2 と呼ばれている。中枢では CRHR-1 は新皮質、小脳、視床下部、下垂体、扁桃体、海馬で発現し、ストレスに対する不安関連行動、条件付け、免疫系への関与が明らかになっている。CRHR-2 は視床下部、下垂体、扁桃体、海馬中隔で発現し、不安関連行動などに関与する。おもに CRHR-1 に作用する CRH に対し、CRHR-2 に作用する関連ペプチドとして、urocortin-1, 2, 3 が発見された⁴⁾。このようなストレスホルモンはマウスの生体の学習や記憶に関して様々な影響を及ぼす⁵⁾。

また、ストレスホルモン以外に記憶と学習に関して、関与が深いと知られているのが脳内の、 β アミロイドとミクログリアである。 β アミロイドは脳内で作られるタンパク質の一種で、健康な人の脳にも存在する物質である。通常は脳内のゴミとして短期間で分解、排出される。しかし、 β アミロイド同士がくっついて異常な β アミロイドができると、排出されずに脳に蓄積され、健康な神経細胞にも変化をもたらし、神経細胞が死滅して情報の伝達ができなくなり徐々に脳が委縮するといわれている。とくにアルツハイマー病の認知症にみられる老人班の大部分を構成している⁶⁾。今回の研究においてもマウスの全脳での発現を解析した。また、ミクログリアはグリア細胞の一つであるが、細胞表面抗原の共通性から免疫を担当する脳内マクロファージと見なされてきた⁷⁾。正常時のミクログリアは静止型として存在するが、脳損傷時や炎症をともしなう神経疾患時には、ミクログリアは病変部に集積し活性型となり増殖する。また、活性型のミクログリアは神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病) や脳梗塞、脳腫瘍で病変部に集積している⁸⁾。今回の研究では、ミクログリアの脳内の発現そのものに変化が起こるかどうかを解析するため、静止型と活性型とは分けずに検討した。Iba-1 (Ionized calcium binding adapter molecule-1) は、中枢神経系ではミクログリアに特異的に発現するタンパク質であるので、今回はミクログリアのマーカーとして Iba-1 の発現を解析した。

本研究では、長期の UVA 眼照射が、マウスの記憶・学習能力と行動量に影響をもたらすのかを検討し、ROS, CRH, urocortin 2, CRHR-1, 2, β アミロイド, Iba-1 (ミクログリア) に着目し解析した。

2. 方 法

2-1. 動物実験

本研究では、8 週齢の specific-pathogen-free (SPF) の雄へアレスマウス (HR-1 マウス: SLC, Hamamatsu, Shizuoka, Japan) を使用した。HR-1 マウスは特に認知機能低下をきたしやすいマウスではないが、毛による紫外線照射線

量の減少がなく検討できるため紫外線照射研究で用いられている。マウスは温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ で 12 時間の明暗周期状況で飼育した。マウスは各 10 匹ずつ 3 群；コントロール群（Cont：可視光線のみで紫外線照射なし）、UVA 皮膚照射群（Skin）、UVA 眼照射群（Eye）に分けた。UVA 照射の際は、ネンブタール麻酔下にて実施した。Eye 群は、眼にのみ照射されるように皮膚にはアルミホイルを巻いて UVA を遮断した。Skin 群は皮膚にのみ照射されるように眼にはアルミホイルを巻いて照射した。UVA ランプは FL20SBLB-A（波長：320–400 nm, 最大吸収波長：352 nm; Toshiba Co., Tokyo, Japan）を使用し、 110 kJ/m^2 で照射した。コントロール群は同様の麻酔下にて可視光線（400–700 nm）を照射した。各群のマウスは約 1 年の期間、週 3 回（月・水・金 / 週）照射した。1 年後にこの照射量でマウスの眼に損傷（角膜の炎症やレンズの白濁）は起こらないことを過去に確認している⁹⁾。

2-2. 動物倫理に関わる事項

本研究は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication)」及び、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従い行われた。全ての実験プロトコルは、鈴鹿医療科学大学動物実験倫理委員会の承認を得た（承認番号 34 番）。

2-3. オープンフィールドテスト

マウスの行動量（motor activity）を計測するために、オープンフィールド用装置（縦 40 cm × 横 50 cm × 高さ 50 cm）を用意し、70 ルクスの明るさで使用した。各群のマウスを 1 匹ずつ装置にに入れて、15 分間の移動距離を video-tracking system (Smart 2 software, Panlab, Barcelona, Spain) で撮影し解析した¹⁰⁾。

2-4. モリス式ウォーターメイズ（水迷路）テスト

空間学習と記憶のための非常に一般的な実験であるモ

リス水迷路テストを行った。プール水面のすぐ下に隠されたプラットフォームを沈め、マウスが水に入れられた後、そのプラットフォームにたどり着くまでの時間を計測した。練習（トライアル）ではプラットフォームにたどり着いて 60 秒間待ち、周りの空間認識をマウスが行う時間をとった。何度か本番前にトライアルさせることで、プラットフォームの場所を学習・記憶させておいた。今回は、本番 2 週間前から、週 1 回ずつ計 2 回トライアルを行い、本番での時間を記録した¹¹⁾。

2-5. CRHR-2 アンタゴニスト投与実験

CRHR-2 のアンタゴニストである Antisauvagine-30（100 mg/kg; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）を生理食塩水に溶かし、1 年間週 3 回（月・水・金 / 週）マウスの脳室内に投与しながら、UVA 眼照射と同様の実験を行った。脳室内投与は耳の後方をつかんで台上に頭部をおさえつけ、頭頂部をアルコール綿で拭ったのち耳根部と眼の後縁の間で正中線をややそれた個所に針を垂直に刺しこみ試薬を注入する方法を行った¹²⁾。同様の方法で生理食塩水のみ脳室内投与し UVA 眼照射を行う群（Water）と脳室内投与も UVA 眼照射も無い群（Control）を対照群とした。

2-6. CRHR-2 アゴニスト投与実験

長期 UVA 眼照射で起こる変化が、urocortin 2 の作用かを検討するために、UVA 眼照射を行わないマウスに CRHR-2 アゴニストである urocortin 2（100 mg/kg; Peptide Institute, Ibaraki, Osaka, Japan）を生理食塩水に溶かし、1 年間週 3 回（月・水・金 / 週）脳室内に投与した。脳室内投与の方法は 2-5 と同様である。脳室内投与も UVA 眼照射も無い群（Control）と UVA 眼照射群（UVA irradiation）を対照群とした。

2-7. N-acetylcysteine (NAC) 投与実験

ROS のスカベンジャーである N-acetylcysteine (NAC:

Tesque, Kyoto, Japan) を 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし, 200 mg/kg の濃度で 1 年間週 3 回 (月・水・金/週) 脳室内に投与しながら, 長期 UVA 眼照射と同様の実験を行った。脳室内投与の方法は 2-5 と同様である。生理食塩水のみ脳室内投与し UVA 眼照射を行う群 (Water) と脳室内投与も UVA 眼照射も無い群 (Control) を対照とした。

2-8. 脳内における ROS, CRH, urocortin 2 の測定

UVA 照射実験 1 年後, マウスを解剖し, 全脳を採取し組織 100 mg を組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan) に浸透漬し, 氷上でハンドミキサーを用いてホモジネートした。ホモジネートしたあと, 上清を 10 μ L 使用し, Enzyme linked Immunosorbent (ELISA) assay kit により CRH, urocortin 2 と ROS を計測した。ROS は Oxi Select TM In Vitro ROS/RNS assay kit (STA-347; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) を使用し計測した。CRH と urocortin 2 は ELISA assay kit (Yanaihara Co., Ltd., Shizuoka, Japan) により計測した。

2-9. マウス全脳のウェスタンブロット

1 年後の全ての群のマウスを解剖し全脳を採取し, 組織 100 mg を組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan) に浸透漬し, 氷上でハンドミキサーを用いてホモジネートした。懸濁液 500 μ L 添加したあと 8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離したのち, その上清を 5 μ L 使用し, ウェスタンブロットを行った。総タンパク質量 12.5 μ g となるようにサンプルを調整し, 4-12% BIS-TRIS Blot gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて 200V の定電圧で電気泳動を行った。電気泳動後, iBlot Western blotting system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてニトロセルロース膜へタンパク質の転写を行い, 4 $^{\circ}$ Cで一晩, 5% スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後, 25 $^{\circ}$ Cで 1 時間, 各 1 次抗体で処理した。使用した 1 次抗体は CRHR-1 (1:1000; Gene Tex Inc., Irvine, CA, USA), CRHR-2 (1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), β -amyloid (1:1000; Rack

land Inc. Gilbertsville, PA, USA), Iba-1 (marker of microglia, 1:1000, Wako, Osaka, Japan) と β -actin (1:5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) である。また, 2 次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識された 2 次抗体 (1:1000; Novex, Frederick, MD, USA) を使用し Immuno Star Zeta reagent (Wako) で反応させた。その後, Multi-Gauge software program (Fujifilm, Greenwood, SC, USA) を用いて撮影し解析した。

2-10. 統計処理

全てのデータは, the means $\pm$ standard deviation (SD) で表示している。統計の有意差は SPSS version 20 (IBM, Armonk, NY, USA) を使用し Tukey's post hoc test で検討した。Microsoft Excel 2010, with a one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて $p < 0.05$ により表示した。

3. 結 果

3-1. UVA 照射後のマウス行動試験結果

全て実験開始 1 年後の結果である (6ヵ月後のモリス式ウォーターメイズテストでは有意差は認められなかった)。Fig.1-A では, 記憶・学習能力を検討したモリス式ウォーターメイズテストの結果, プラットホームまでの遊泳時間は, 対照群 (Control) に比べ, 皮膚照射群 (Skin) で増加傾向にあった。また, UVA 眼照射群 (Eye) は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin) に比べ有意に増加した。Fig.1-B では, 行動量は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin), UVA 眼照射群 (Eye) の 3 群間に有意差は無かった。

3-2. ストレス物質の解析

Fig.2 では, ストレス物質である ROS, CRH, urocortin 2 を解析した。ROS, CRH, urocortin 2 とも対照群 (Control) に比べ, 皮膚照射群 (Skin) で有意に増加した。また, 3 項目とも UVA 眼照射群 (Eye) は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin) に比べ有意に増加した。

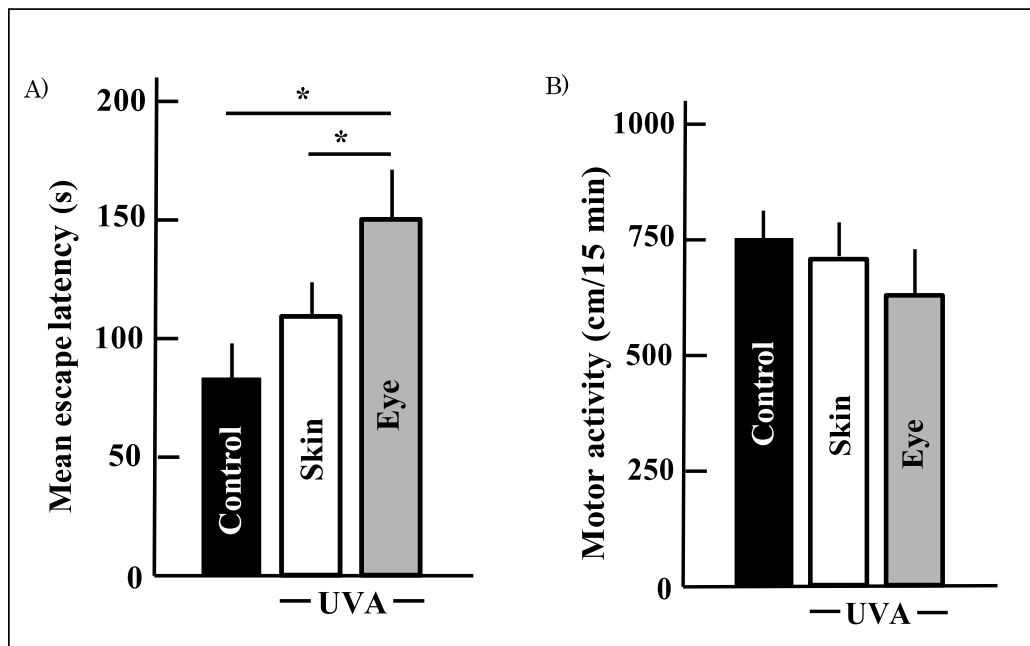


Fig. 1. Effects of long-term UVA irradiation on the memory and learning ability (A) and motor activity (B) in the mice.

We used the Morris water maze for measuring the memory and learning ability. Values are expressed as the means $\pm$ standard deviation (SD) derived from ten animals. * $p < 0.05$

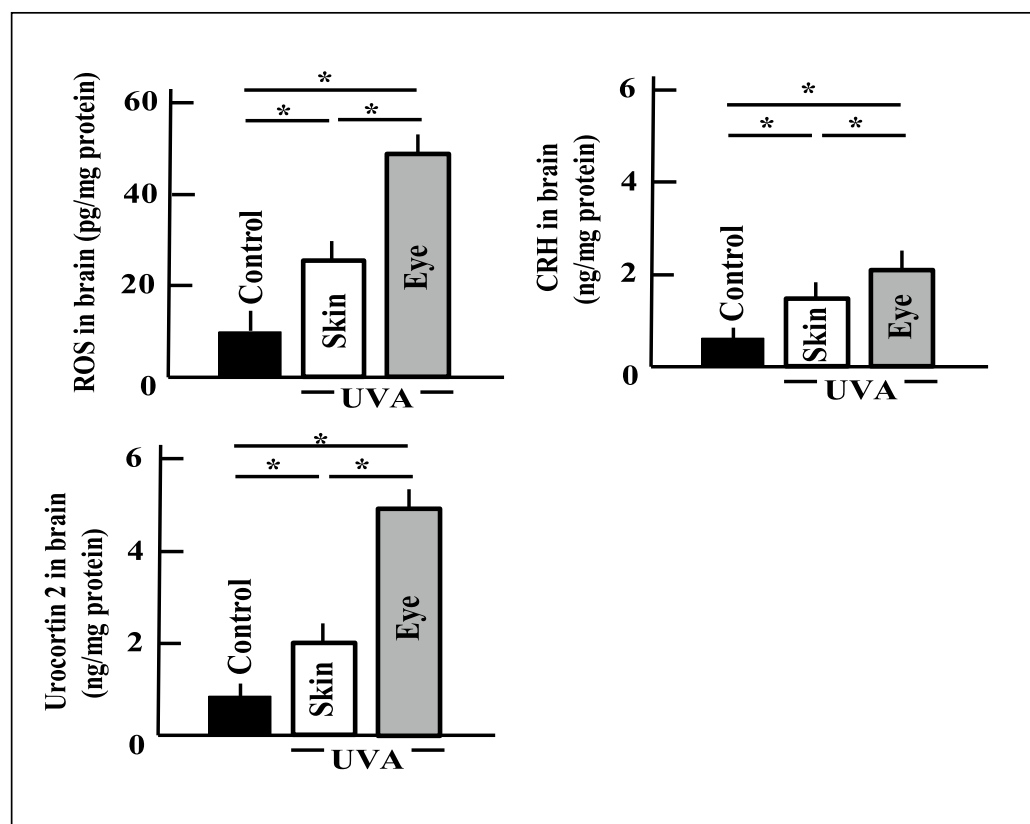


Fig. 2. Effects of long-term UVA irradiation on the ROS, CRH, and urocortin 2 levels in the brain.

Values are expressed as the means $\pm$ SD derived from ten animals. * $p < 0.05$.

3-3. 脳の CRHR-1, CRHR-2, β アミロイド, Iba-1 の解析

Fig.3 では CRH, urocortin 2 の受容体である, CRHR-1 と CRHR-2 の発現をウェスタンブロットにより解析した。CRHR-1 は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin), UVA 眼照射群 (Eye) の 3 群間に有意差は無かった。CRHR-2 は対照群 (Control) に比べ, 皮膚照射群 (Skin) で有意に増加した。さらに UVA 眼照射群 (Eye) は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin) に比べ有意に増加した。また, β アミロイド (β -amyloid) と, Iba-1 の発現をウェスタンブロットにより解析した。 β アミロイドも Iba-1 も対照群 (Control) に比べ, 皮膚照射群 (Skin) で有意に増加した。さらに β アミロイドも Iba-1 も UVA 眼照射群 (Eye) は対照群 (Control), 皮膚照射群 (Skin) に比べ有意に増加した。

3-4. CRHR-2 アンタゴニスト投与実験

Fig.4 では CRHR-2 のアンタゴニストである Antisauvagine-30 を 1 年間 (週 3 回: 月・水・金/週) 脳室内に投与しながら, 同様の長期 UVA 眼照射実験を実施した。モリス式ウォーターメイズテストの結果, プラットホームまでの遊泳時間では, アンタゴニスト投与群 (Antisauvagin-30) は, UVA 眼照射群 (Water) に比べ有意に減少した (Fig.4-A)。脳内の β アミロイドの発現はアンタゴニスト投与群 (Antisauvagin-30) と長期 UVA 眼照射群 (Water) の間に有意差は見られなかった。Iba-1 の発現もアンタゴニスト投与群 (Antisauvagin-30) と長期 UVA 眼照射群 (Water) に有意差は見られなかった (Fig.4-B)。

3-5. CRHR-2 アゴニスト投与実験

Fig.5 では長期 UVA 眼照射をせずに, CRHR-2 のアゴニスト (urocortin 2) を 1 年間 (週 3 回: 月・水・金/週) 脳室内に投与した群 (Urocortin 2 non-UVA) と長期 UVA 眼照射群 (UVA eye irradiation) と長期 UVA 眼照射

も脳室内投与もない群 (Control) で比較した。モリス式ウォーターメイズテストの結果, プラットホームまでの遊泳時間は, 長期 UVA 眼照射群 (UVA eye irradiation) に比べて CRHR-2 アゴニスト投与群 (Urocortin 2 non-UVA) は有意に減少した (Fig.5-A)。脳内の β アミロイドと Iba-1 の発現は UVA 眼照射群 (UVA eye irradiation) に比べて CRHR-2 アゴニスト投与群 (Urocortin 2 non-UVA) は有意に減少した (Fig.5-B)。

3-6. NAC 投与実験

Fig.6 では ROS のスカベンジャーである NAC を 1 年間 (週 3 回: 月・水・金/週) 脳室内投与しながら, 長期 UVA 眼照射実験を実施した。NAC 投与群 (NAC) は長期 UVA 眼照射群 (Water) に比べモリス式ウォーターメイズテストの結果, プラットホームまでの遊泳時間は有意に減少した (Fig.6-A)。脳内の urocortin 2 の発現は, NAC 投与群 (NAC) は長期 UVA 眼照射群 (Water) に比べ有意に減少した (Fig.6-B)。脳内の β アミロイドの発現は NAC 投与群 (NAC) と長期 UVA 眼照射群 (Water) を比べると有意差は認められなかった。Iba-1 の発現は NAC 投与群 (NAC) と長期 UVA 眼照射群 (Water) を比べると有意に減少した。

4. 考 察

Fig.1 のモリス式ウォーターメイズテストの結果から, 皮膚照射群, 眼照射群ともに長期 UVA 照射がマウスの記憶・学習能力の低下を引き超す可能性が考えられた。とくに, 皮膚照射群より眼照射群のほうが, マウスの記憶・学習能力の低下が顕著であり, そのため脳への影響が比較的大きいのではないかと考えた。行動量の変化は, 長期 UVA 照射群と対照 (UVA 照射無し) 群との間に有意差はなかったため, 長期 UVA 照射の影響は行動や運動に関する脳機能には, 今回は影響が少ないと思われた。

長期 UVA 照射はマウスにストレスをもたらすと考えたため, Fig.2 でマウス全脳での ROS, CRH, urocortin 2 の発現を解析した。長期 UVA 照射群では対照 (UVA 照

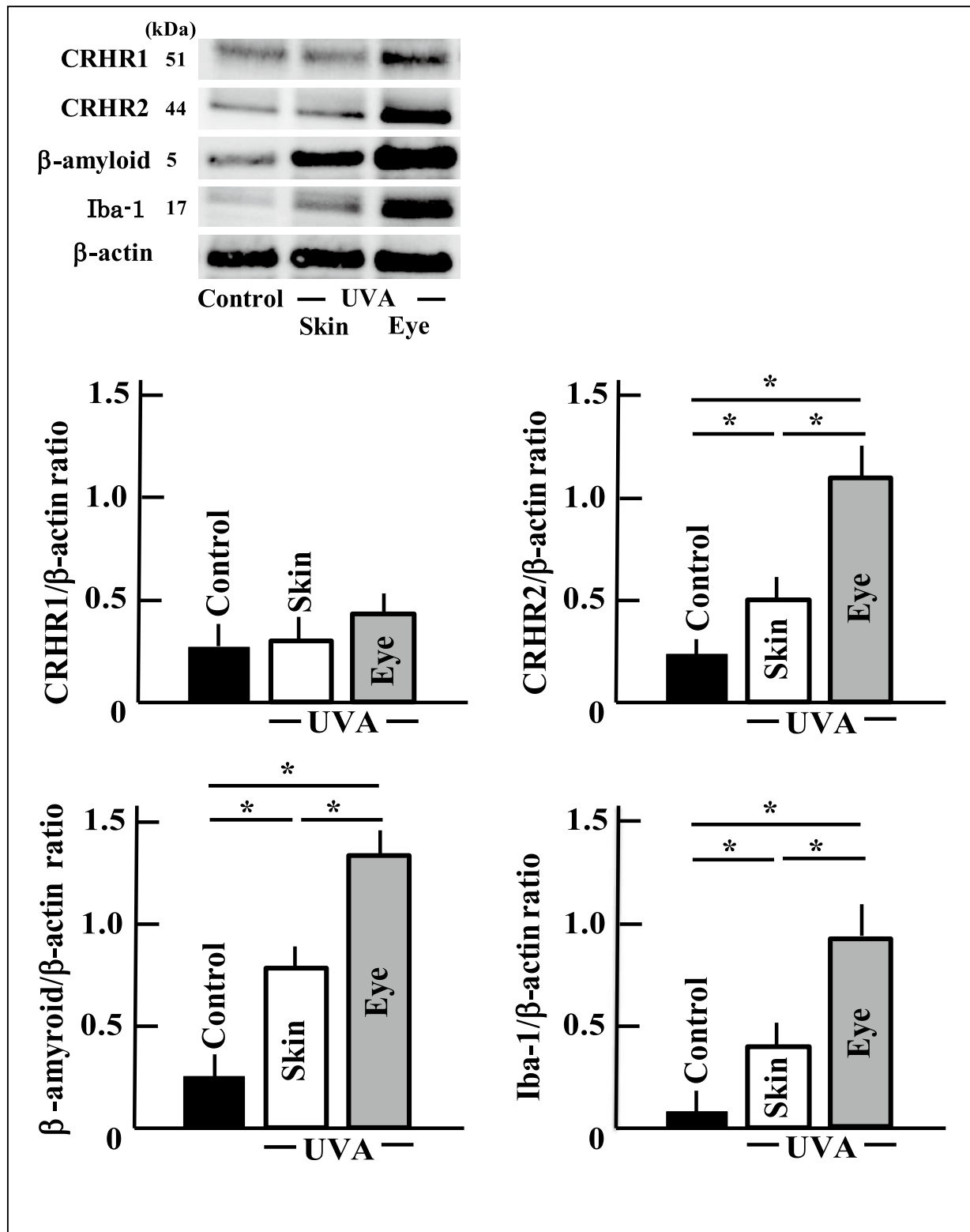


Fig. 3. Effects of long-term UVA irradiation on the expression of CRHR-1, CRHR-2, β-amyloid, and Iba-1 in the brain. Values are expressed as the means ± SD derived from ten animals. *p < 0.05.

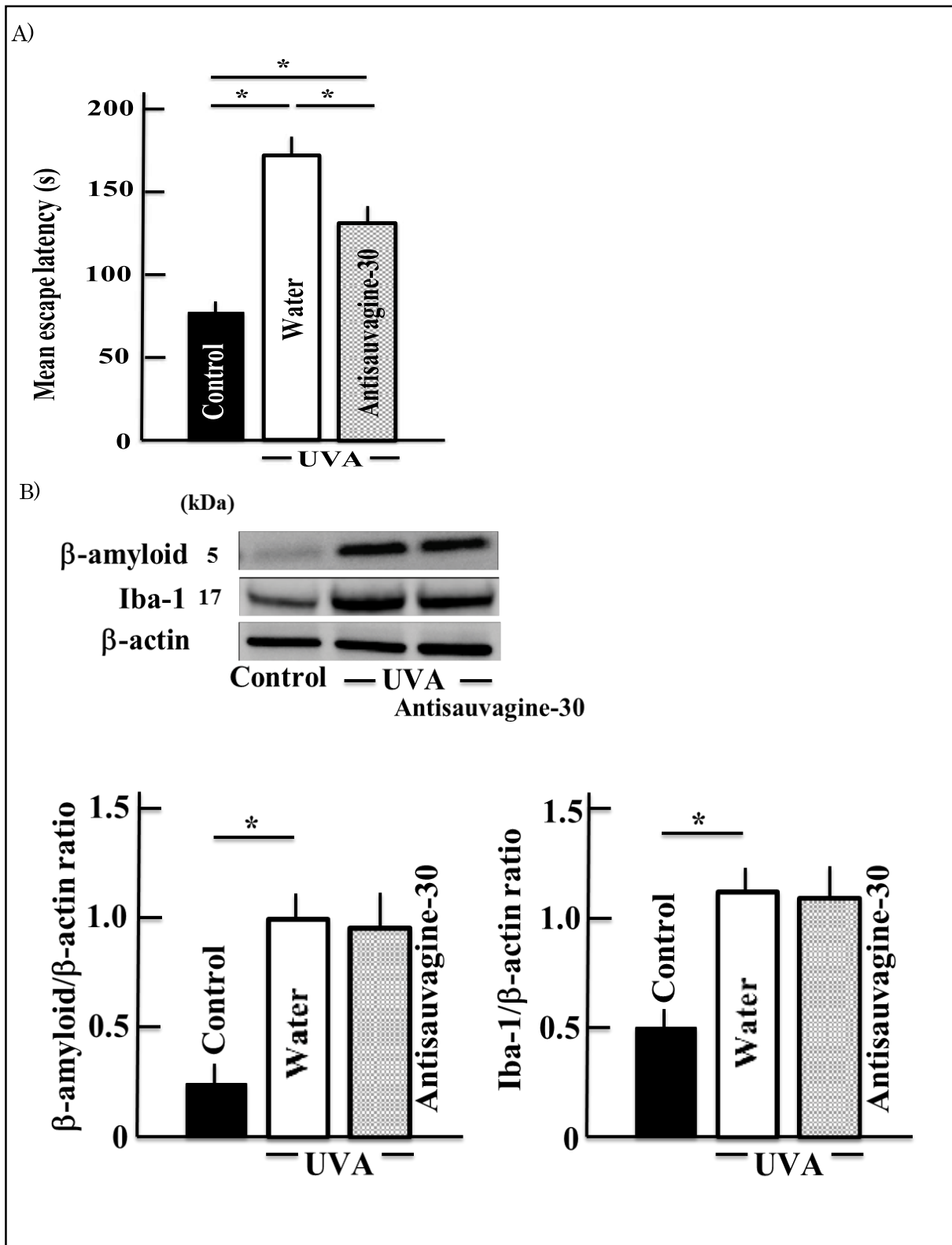


Fig. 4. Effects of CRHR-2 antagonist (Antisauvagine-30) treatment on long-term UVA eye irradiated mice.

(A) memory and learning ability (mean escape latency), and (B) the expression of β -amyloid and Iba-1 in the brain. Values are expressed as the means $\pm$ SD derived from ten animals. * $p < 0.05$.

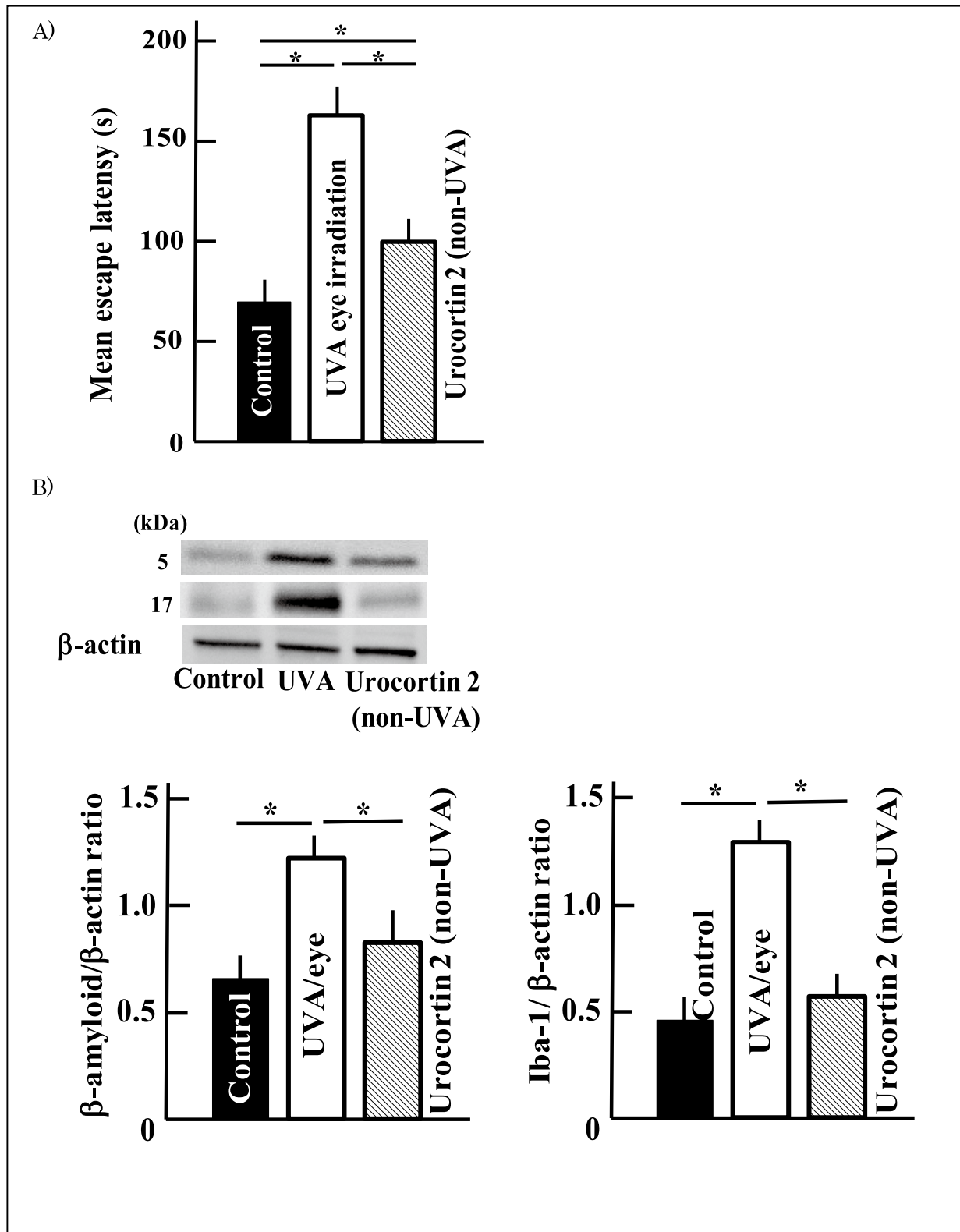


Fig. 5. Effect of CRHR-2 agonist (urocortin 2) treatment on long-term UVA eye irradiation mice.

(A) memory and learning ability (mean escape latency), and (B) the expression of β -amyloid and Iba-1 in the brain. Values are expressed as the means $\pm$ SD derived from ten animals. * $p < 0.05$.

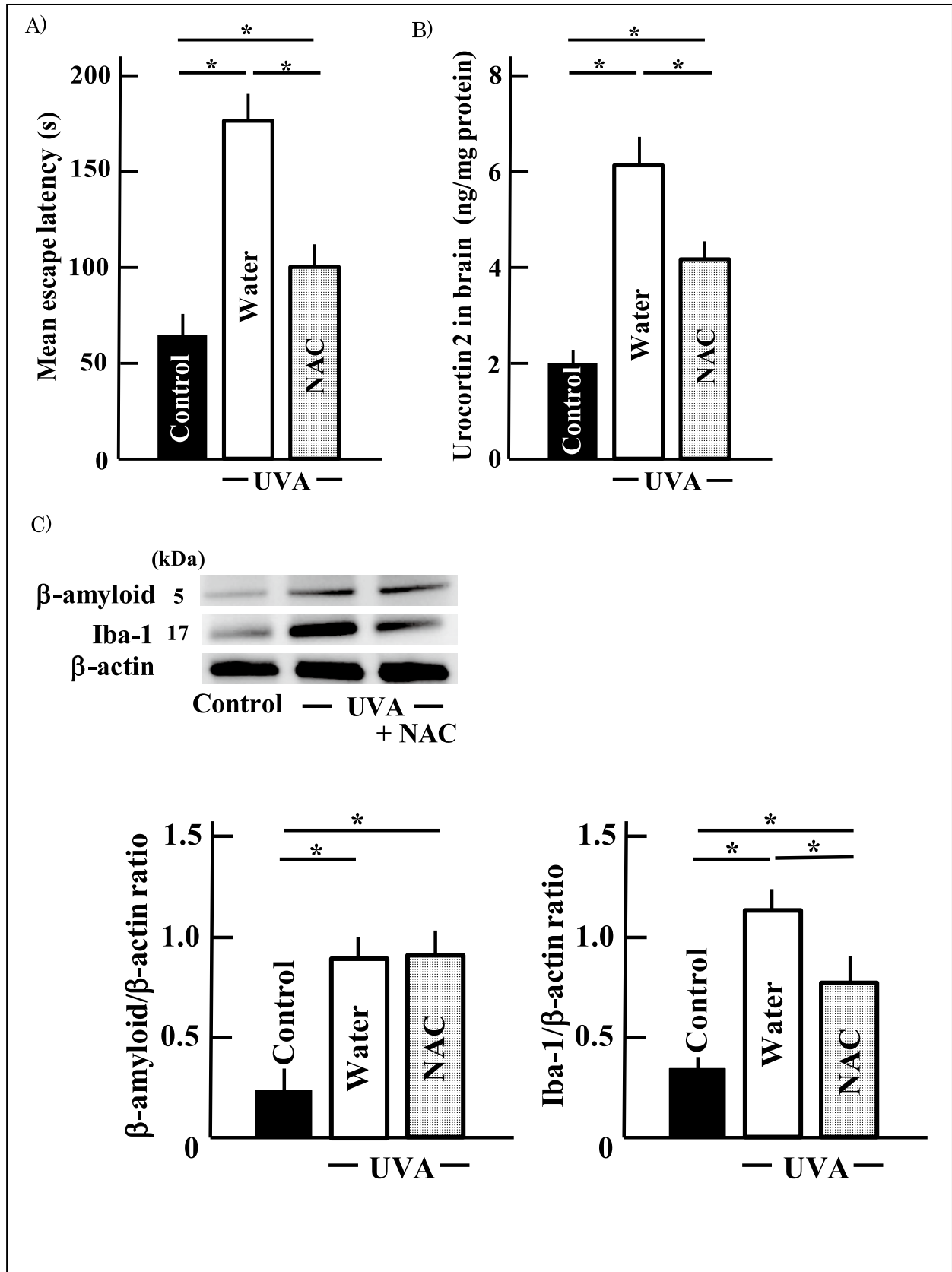


Fig. 6. Effect of active oxygen scavenger (NAC) treatment on the long-term UVA eye irradiated mice.

(A) memory and learning ability (mean escape latency), (B) urocortin 2 level in brain, and (C) the expression of β -amyloid and Iba-1 in the brain. Values are expressed as the means $\pm$ SD derived from ten animals. * $p < 0.05$.

射無し) 群に比べ、3 項目とも増加したが、皮膚照射群に比べ、眼照射群のほうが 3 項目とも顕著に増加した。このことから、長期 UVA の眼への照射は皮膚への照射に比べマウスにはストレスが大きいと考えた。

Fig.3 では、Fig.1 で増加したストレスに関与する CRH と urocortin 2 の各々の受容体である CRHR-1 と CRHR-2 の全脳での発現を解析した。CRHR-1 は対照 (UVA 照射無し) 群と長期 UVA の眼照射群と皮膚照射群との間に有意な差は無かった。一方、CRHR-2 では対照 (UVA 照射無し) 群に比べ、長期 UVA 照射群のほうが増加しており、特に眼照射群のほうが皮膚照射群に比べて顕著に増加していた。それゆえ、CRHR-2 を介して Fig.2 で増加した urocortin 2 がマウスの記憶・学習能力低下に影響をしているのではないかと考えた。また、脳内の β アミロイドと、Iba-1 (ミクログリアのマーカー) の発現は長期 UVA 眼照射群のほうが皮膚照射群と比べて顕著に増加していたため、長期 UVA 眼照射による記憶・学習能力低下には urocortin 2 に加えて、 β アミロイドとミクログリアも関与している可能性が考えられた。

Fig.4 で長期 UVA 眼照射に加えて CRHR-2 のアンタゴニストである Antisauvagine 30 を投与すると、長期 UVA 眼照射によるプラットホームまでの遊泳時間が短縮されたため、記憶・学習能力の低下が抑制されたと考えた。しかし、遊泳時間は対照 (UVA 照射無し) 群のレベルまでではなかった。そのため、CRHR-2 以外の経路も長期 UVA 眼照射による記憶・学習能力の低下に関与していると考えた。また、アンタゴニスト投与では、長期 UVA 眼照射により増加した β アミロイドと Iba-1 の発現には変化がないため、これらの増加には他の要因が考えられた。

さらに、CRHR-2 のアゴニストである urocortin 2 そのものの影響を確認するため Fig.5 で長期 UVA 眼照射を行わず、CRHR-2 アゴニストの urocortin 2 投与を同期間行った。すると、長期 urocortin 2 投与で、長期 UVA 眼照射の影響である記憶・学習の低下は引き起こされたが、長期 UVA 眼照射ほどの低下ではなかった。そのため、長期 UVA 眼照射の影響である記憶・学習の低下に urocortin 2 は関与をしているが、他の要因もあるのではないかと考えた。また長期 UVA 眼照射で増加した、 β ア

ミロイドと Iba-1 は長期 urocortin 2 投与では増加が起らなかったため、我々は β アミロイドと Iba-1 の増加には、Fig.2 で増加していた ROS の影響が考えられるのではないかと予想した。

Fig.6 で ROS のスカベンジャーである NAC を用いて同様の長期 UVA 眼照射の実験を行うと、長期 UVA 眼照射でもたらされた、記憶・学習能力の低下が NAC の投与により抑制された。また、長期 UVA で眼照射で増加した urocortin 2 も NAC の投与で減少した。これらから、長期 UVA 眼照射により ROS が増加することで、urocortin 2 の増加をもたらし、記憶・学習の低下に影響をもたらした可能性が示唆された。長期 UVA 眼照射による脳内の β アミロイドの発現の増加は、NAC 投与により変化はなかったが、Iba-1 の発現の増加は抑制されたため、長期 UVA 眼照射による記憶・学習の低下には増加した ROS がもたらすミクログリアの影響も考えられた。

以上のことから、長期 UVA 眼照射による記憶・学習能力の低下は、脳内で増加した ROS の刺激による、urocortin 2、CRHR-2 の増加とミクログリアの増加が関与している可能性が示唆された。本研究では現象のみで詳細なメカニズムは、明確にできなかったが、長期 UVA 眼照射はマウスの脳内の urocortin 2 やミクログリアに変化をもたらす可能性が考えられるため、脳の病理学的検討も今後必要であると考えている。

長期間の UVA 照射は、慢性的な酸化ストレスを引き起こし、炎症を誘導する¹³⁾。特に CRH と urocortin 2 は生理的ストレスにより引き起こされる重要な神経分泌物である¹⁴⁾。CRH は CRHR-1 受容体に親和性が高く、urocortin 2 は CRHR-2 受容体に親和性が高い¹⁵⁾。今回の結果では、長期 UVA 眼照射によりマウスの脳の CRH と urocortin 2 はともに対照 (UVA 照射無し) 群に比べて増加したが、受容体の CRHR-1 と CRHR-2 では、CRHR-2 のみ長期 UVA 眼照射による変化が確認された。そのため CRHR-2 に親和性の高い urocortin 2 により着目した。また、ストレスにより増加した urocortin 2 は、記憶能力に影響するとの報告もある¹⁶⁾。

本研究では、urocortin 2 や CRHR-2 とミクログリアとの相互関与は検討できなかったが、ミクログリアには CRH

の受容体が発現しているとの報告もあり *in vitro* での検討も今後考慮に入れたい。ミクログリアは諸刃の刃と呼ばれ、活生化にともない炎症性サイトカイン、ROS、アデノシン三リン酸などの神経障害因子を産生し、一方、静止型のミクログリアは様々な神経栄養因子、神経保護因子を産生する¹⁷⁾。今回の長期 UVA 眼照射の解析では、ミクログリアを活性型、静止型と分別して解析はしていないが、今回、発現に変化のあつたミクログリアがどの型かなども興味深い点である。また、人間のアルツハイマー病の脳には β アミロイドが異常蓄積されるが、この β アミロイドの蓄積された場所には、脳の免疫担当細胞であるミクログリアが活生化して集積している¹⁸⁾。ミクログリアは脳内の環境変化を敏感にとらえるセンサーとして働き、障害性ストレスに対して応答反応を示すといわれている、そのため、長期 UVA 眼照射のストレスなども今回影響している可能性があるため、詳細な検討が今後必要である。

本研究では、長期 UVA 眼照射により、マウスの記憶・学習能力の低下を引き起こす可能性が示され、脳内の ROS, CRHR-2, urocortin 2, β アミロイド、ミクログリアの関与が示されたが、現象にとどまるものが多く、さらに詳細な研究が必要であると考えている。

5. 終わりに

本研究により、長期 UVA の眼への照射はマウスの記憶・学習能力の低下を引き起こす可能性が示されたが、今回の結果はあくまでも現象が多くマウスでの動物実験の結果であるので、人間でどのような影響が起こるかは不明である。紫外線照射に関しては、皮膚照射への影響は日焼けや、皮膚がんなど良く知られている。人間の場合、日常生活で皮膚は衣服やサンスクリーンなどにより紫外線からの直接照射が防御されていることが多い。しかし、眼は通常外界にさらされていることが多く、日焼けした皮膚のように紫外線がどれだけ影響しているかを見てとらえにくい。今回、マウスではあるが長期間の UVA 照射は皮膚以外の眼という器官からも生体に影響をもたらす可能性があることが伺えたのは興味深いことであった。長期 UVA 照射の刺激が眼を介して、どのようなシグナル

でマウスの脳に今回の影響をもたらしたのか、詳細なメカニズムの検討は今後必要であると思われる。

文 献

- 1) Susanne G, Meinhard W, Jean K, Karin S. Photodamage and photoaging-prevention and treatment. Review. J Dtsch Dermatol Ges. 3(2): 19-25. 2005.
- 2) Hiramoto K, Jikumaru M, Yamate Y, Sato EF, Inoue M. Ultraviolet A irradiation of the eye induces immunomodulation of skin and intestine in mice via hypothalamo-pituitary-adrenal pathways. Arch Dermatol Res. 301(3): 239-244. 2009.
- 3) Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science. 213:1394-1397. 1981.
- 4) Henckens MJ, Deussing JM, Chen A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. Nat Rev Neurosci. 17:636-651. 2016.
- 5) Yamada K, McEwen BS, Pavlides C. Site and time dependent effects of acute stress on hippocampal long-term potentiation in freely behaving rats. Exp Brain Res. 152:52-59. 2003.
- 6) Huiqin Z, Xuefan J, Lina M, Wei W, Zehui L, Surui C, Jiayu W, Jiahui S and Hao L. Role of A β in Alzheimer's-related synaptic dysfunction. Front Cell Dev Biol. DOI 10.964075. 2022.
- 7) Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Res Bull. 87:10-20. 2012.
- 8) McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. Brain Res Rev. 21(2): 195-218. 1995.
- 9) Hiramoto K, Kasahara E. Long-term UVA eye irradiation causes decreased learning ability in mice. Photodermatol

- Photoimmunol Photomed. 32: 129-135. 2016.
- 10) Ann-Katrin K, Paul CG, Zoltan S. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol.* 1916: 99-103. 2019.
 - 11) Morris RGM. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11: 47-60. 1984.
 - 12) 藤原公策. 実験動物の保定と麻酔 獣医麻酔 4:1-8. 1973.
 - 13) Hiramoto K, Yamate Y. Gp91phox-derived Reactive Oxygen Species/Urocortin 2/Corticotropin-releasing Hormone Receptor Type 2 Play an Important Role in Long-term Ultraviolet A Eye Irradiation-induced photoaging. *Photochemistry and Photoimmunology.* 92: 180-186. 2016.
 - 14) Tillinger A, Nostramo R, Kvetnansky R, Serova L, Sabban EL. Stress-induced changes in gene expression of urocortin 2 and other CRH peptides in rat adrenal medulla: involvement of glucocorticoids. *J Neurochem.* 125: 185-192. 2013.
 - 15) 牧野晋也, 橋本浩三. ウロコルチン 医学のあゆみ 210(4): 256-260. 2004.
 - 16) Radulovic J, Ruhmann A, Liepold T, Spiess J. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci.* 19(12): 5016-5025. 1999.
 - 17) 錫村明生. 神経変性疾患, 神経炎症とミクログリア 臨床神経学 54(12): 1119-1121. 2014.
 - 18) 最上(重本)由香里, 佐藤薫 ミクログリアの最近の話題—次々と明らかになるミクログリアの生理的新機能 総説 日薬理誌 140: 216-220. 2012.

— プロフィール —

山手 百合香 鈴鹿医療科学大学薬学科・医化学 助手 博士(医学)

〔経歴〕 1991 年大阪市立大学大学(現:大阪公立大学)医学部医学科卒業, 2011 年大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態学 博士課程修了, 2012 年大阪市立大学大学院医学研究科脳科学寄附講座特任助教, 2015 年大阪大学大学院医学研究科幹細胞応用医学寄附講座臨床研究担当研究員, 2020 年より現職。〔専門〕 光医学光生物学, 生化学, 皮膚科学。

Long-term UVA exposure to the eye compromises memory and learning ability in mice

Yurika YAMATE

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Suzuka University of Medical Science

Key words: UV, Long irradiation, mice, memory and learning ability

Abstract

Long-term eye exposure to ultraviolet (UV)A can effect memory and learning ability. However, the underlying mechanism behind these effects remain unknown. In this study, we used HR-1 mice to study effects of long-term UVA eye irradiation. The eyes or dorsal skin of the mice were exposed to UVA at the dose of 110kj/m² using an FL20SBLB-A lamp three times a week over 12 months. We measured the levels of reactive oxygen species, corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin 2, and CRH type 2 receptor (CRHR-2) in the brain of treated and control animals. Their memory and learning ability following exposure to UVA was analyzed by the standard water maze test. Our results showed that the levels of reactive oxygen species, CRH, urocortin 2, and CRHR-2 increased significantly following long-term UVA irradiation, and the effects were more pronounced in animals subjected to eye irradiation than those subjected to dorsal skin irradiation. Furthermore, the UVA exposure led to an increase in the levels of β -amyloid and microglia in the brain. These results indicated that UVA eye irradiation potentially mediated a decline in memory and learning ability via enhancing levels of urocortin 2, microglia, and β -amyloid in the brain.