

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03185

研究課題名（和文）無機ヒ素暴露によるNrf2活性化の低下が引き起こす認知機能障害の解明

研究課題名（英文）Research on the role of Nrf2 in cognitive dysfunction induced by exposure to inorganic arsenic

研究代表者

高田 礼子（TAKATA, Ayako）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30321897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、無機ヒ素（iAs）暴露による認知機能障害は血液脳関門（BBB）のタイトジャンクション（TJ）傷害に起因すると推測している。rat in vitro BBB modelを用いて検証した結果、TJ傷害は濃度依存的なiAs暴露により発生し、Nrf2とHO-1の作用との関係も明らかになった。本研究は、iAs暴露による認知機能障害について実験的検証の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
無機ヒ素暴露からの認知機能障害に関する解明研究は公衆衛生学において重要な課題である。動物での実験的検証には時間や費用、技術的な問題があった。本研究では、人間や動物の血液脳関門（BBB）を模範したrat in vitro BBB modelの有効性を証明し、当該研究の促進や発展に貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Epidemiological studies have revealed cognitive dysfunction caused by inorganic arsenic (iAs) exposure, but experimental validation is understood to be difficult. We speculate that cognitive dysfunction following exposure to iAs is caused by tight junction (TJ) injury at the blood-brain barrier (BBB). Validation using the rat in vitro BBB model showed that TJ injury is caused by concentration-dependent exposure to iAs and is also related to the action of Nrf2 and HO-1. This study suggests significant potential for experimental verification of cognitive dysfunction from iAs exposure. An essential result of this research is the identification of methylation as a detoxification mechanism for iAs in the brain. Furthermore, inhibiting TJ injury by antioxidant stress responses has been shown to be a potential preventive measure against cognitive dysfunction.

研究分野：衛生学

キーワード：ヒ素 認知機能障害 血液脳関門 タイトジャンクション傷害 Nrf2 メチル化 in vitro BBB model

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

無機ヒ素 (iAs) の飲料水汚染が原因で発生した慢性ヒ素中毒はアジアや中南米諸国にて大規模に発生し、現在でも終息に至っていない。慢性ヒ素中毒の発生地域における新たな健康影響の問題として、小児の認知能力 (cognitive abilities) の障害について疫学研究にて明らかにになり、WHO も胎児期や乳児期での iAs 暴露からの認知能力の障害の問題に警鐘を鳴らしている<sup>1)</sup>。さらに、非ヒ素汚染地域において食事から摂取する iAs による小児の認知能力への影響も危惧されている。一方、慢性ヒ素中毒の発生地域での成人における認知機能障害の発生も明らかになり、すなわち、iAs 暴露からの認知機能障害は小児や成人での問題であると認識され始めた。現代社会では、様々な原因にて認知機能障害が発生しており、iAs もその原因の一つであるか否かの検証は公衆衛生学における重要な課題である。

他方、疫学研究からの知見に対する実験的な証明が難しく、特に、iAs の血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) における定量的な透過率の測定、そして、BBB のタイトジャンクション (TJ) 傷害の評価も技術的に難しい問題が存在している。我々は、iAs 暴露による認知能力の障害や認知機能障害は、最初に BBB の TJ 傷害が発生し、BBB を透過した iAs やその代謝物によりグリア細胞そして神経細胞が傷害される作用機序を考えている。

### 2. 研究の目的

人間と動物の BBB を模範した rat *in vitro*-BBB model を用いて、iAs 暴露による TJ 傷害の発生機序を解明することを目的とした。この研究では、TJ 傷害の発生については iAs とその代謝物での比較、そして、TJ 傷害の有効な指標の検討、また、酸化ストレスとの関係も評価し、iAs 暴露による認知能力障害の発生機序について解明を試みた。

### 3. 研究の方法

ヒ素の試験試薬：三酸化ヒ素 (iAs<sup>III</sup>, Sigma-Aldrich 社製) と monomethylarsonous acid (MMA<sup>III</sup>, Toronto Research Chemicals 社製) を用いた。

*in vitro*-BBB model: Wistar 系ラットの初代脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを共培養して作製した rat *in vitro*-BBB model (PharmaCo-Cell 社製) を用いた。

ヒ素暴露濃度: iAs<sup>III</sup> (1, 10, 20  $\mu$ M) や MMA<sup>III</sup>

(0.1, 1, 2  $\mu$ M) を luminal compartment (blood side) に暴露し、6 時間目及び 24 時間目の abluminal compartment (Brain side) の培地から試料を採取した (図 1)。

TJ 傷害の評価: transendothelial electrical resistance (TEER) と sodium fluorescein (Na-F) の透過係数、そして、Western blot (WB) 分析法および蛍光免疫染色法にて Claudin-5 と ZO-1 の発現を評価した。酸化ストレス応答との関係は、WB 法にて nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) と heme-oxygenase-1 (HO-1) の発現を測定して評価した。

ヒ素の BBB での透過率と代謝: HPLC-ICP-MS (Agilent 社製、Agilent 8800) 法にてヒ素を化学形態別に測定して評価した。

### 4. 研究成果

(1) rat *in vitro*-BBB model におけるヒ素の透過率と代謝

rat *in vitro*-BBB model の blood side に 20  $\mu$ M (3960 ng/ml) - iAs<sup>III</sup> や 2  $\mu$ M (248 ng/ml) - MMA<sup>III</sup> を一回暴露し 24 時間目までの透過率を求めた結果、MMA<sup>III</sup> (53.1  $\pm$  2.72%) が iAs<sup>III</sup> (43.3  $\pm$  0.71%) に比較して高い傾向を認めた ( $p < 0.01$ )。BBB におけるヒ素代謝については、iAs<sup>III</sup> と MMA<sup>III</sup> 共にジメチルアルシン酸 (DMA) が最終代謝物であり、MMA<sup>III</sup> が iAs<sup>III</sup> に比較してメチル化されやすい傾向を認めた。急性や慢性ヒ素中毒患者では、肝臓中において毒性の強い iAs を低毒性の DMA にメチル化する解毒機序が明らかになっている<sup>2)</sup>。本研究において、国際的にも最初となる、BBB 内でのメチル化は脳内に独立した解毒機序である可能性が推測された。

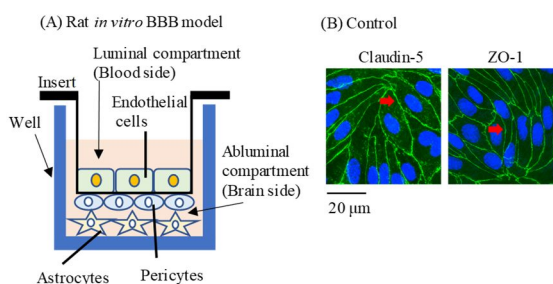


図1 rat *in vitro*-BBB model

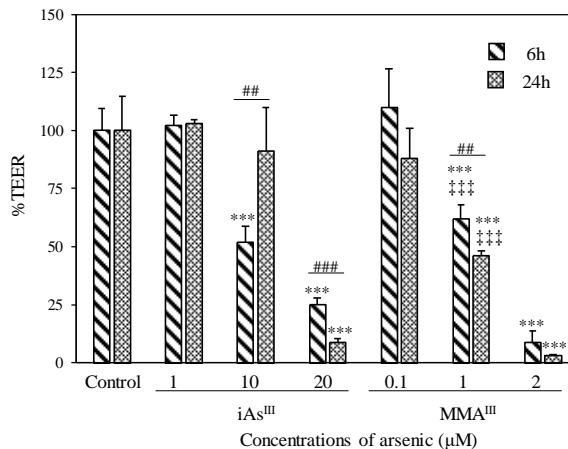


図2 TEER値によるTJ傷害の評価

\*\*\* $p < 0.001$  (vs. control); ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  (6h vs. 24h);  
 ††† $p < 0.001$  (iAs<sup>III</sup> 1  $\mu$ M vs. MMA<sup>III</sup> 1  $\mu$ M)

## (2) TEER 値と Na-F の透過係数による BBB-TJ 傷害の評価

iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> の一回暴露後における 6 および 24 時間目の TEER 値は、iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> 群では対照群に比較して統計学的に有意な濃度依存的な減少傾向を認め、MMA<sup>III</sup> は iAs<sup>III</sup> より有意に強い BBB の TJ 傷害を発生することを明らかにした (図 2)。次に、Na-F 透過係数による TJ 傷害を検討した結果、MMA<sup>III</sup> は iAs<sup>III</sup> より顕著に傷害する傾向も確認された。

## (3) Claudin-5 と ZO-1 による BBB-TJ 傷害の評価

iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> の一回暴露後における 6 および 24 時間目の Claudin-5 タンパクの発現は、iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> 群では対照群に比較して統計学的に有意な濃度依存的な減少傾向を認めた (図 3)。この傾向は ZO-1 タンパクの発現でも確認された。なお、Claudin-5 の発現の抑制は、MMA<sup>III</sup> が iAs<sup>III</sup> より強い傾向を示した。さらに、血管内皮細胞での Claudin-5 や ZO-1 タンパクの発現を蛍光免疫染色法にて評価した結果、Claudin-5 の発現の抑制は iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> に共通して 6 時間目と 24 時間目で確認され、ZO-1 の発現でも同様の傾向を認めた。

iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> 暴露による TJ 傷害は、TEER 値と Claudin-5 タンパクの結果からそれぞれ明確に評価でき、更に組み合わせでの評価が有効であった。

## (4) 酸化ストレス (Nrf2 と HO-1) と TJ 傷害との関係

高濃度の iAs<sup>III</sup> (10 と 20 $\mu$ M) や MMA<sup>III</sup> (2 $\mu$ M) の暴露では血管内皮とペリサイト (EP) 群およびアストロサイト (AST) において、Nrf2 や HO-1 の発現上昇を認めた (図 4)。そして、Nrf2 と HO-1 の発現の間には有意な相関関係が認められた。iAs<sup>III</sup> や MMA<sup>III</sup> 暴露に対し、BBB では酸化ストレス応答として Nrf2 や HO-1 の活性化を確認したが、高濃度暴露では TJ 傷害の発生を抑制できないことも確認された。これらの結果は、BBB の TJ 傷害の抑制や予防には、Nrf2 や HO-1 活性化が重要になることを示唆していた。

## (5) まとめ

rat *in vitro*-BBB model は、特に BBB におけるヒ素代謝と TJ 傷害の研究において、動物実験の代替となる可能性が明らかになった。BBB 内では、iAs<sup>III</sup> と MMA<sup>III</sup> はメチル化および酸化反応を受け、それらが低毒性のメチル化ヒ素化合物に変換した結果が確認され、脳内には独立したヒ素の解毒機序の存在が推測された。一方、本研究では BBB の TJ 傷害は、未変換の MMA<sup>III</sup> は iAs<sup>III</sup> よりも強力であることも確認され、MMA<sup>III</sup> の毒性作用をさらに解明する必要性が明らかになった。iAs 暴露による認知能力障害に関する今後の研究として、BBB の代謝機能や酸化ストレス応答などに焦点を当てた研究の必要性を明らかにした。

## (6) 文献

1. WHO. Arsenic. 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
2. Yamauchi H, Yoshida T, Takata A. Arsenic exposure and health effects: Differences by chemical structure, chemical form and arsenic methylation capacity. In: Huq SMI, editor. Arsenic in the environment - Sources, impacts and remedies. London: IntechOpen; 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1001454>

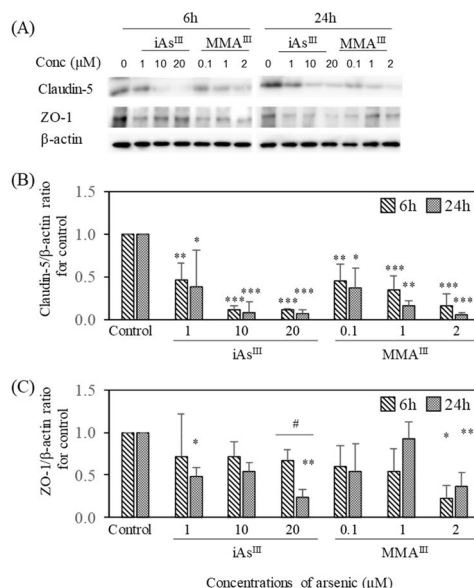


図3 Claudin-5とZO-1タンパクの発現パターン  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control); # $p < 0.05$  (6h vs. 24h).

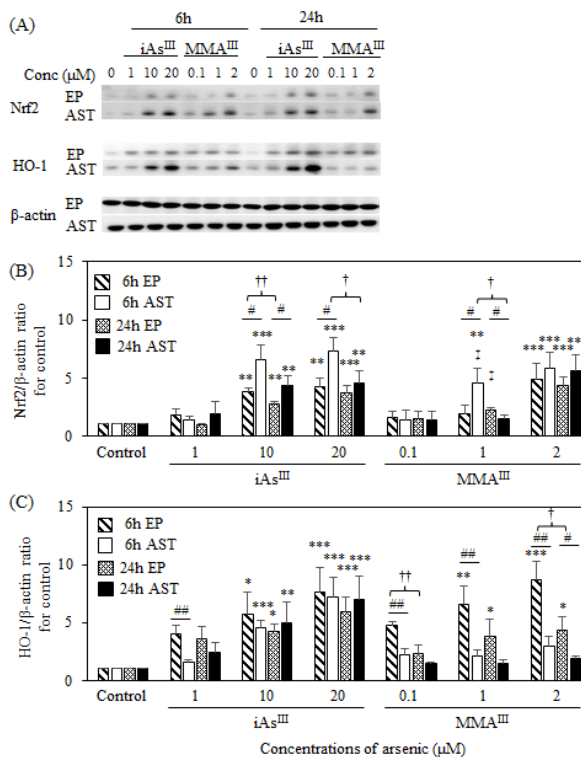


図4 Nrf2とHO-1の発現パターン  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control);  
# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  (EP vs. AST); † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  (6h vs. 24h);  
‡ $p < 0.001$  (iAs<sup>III</sup> 1  $\mu$ M vs. MMA<sup>III</sup> 1  $\mu$ M).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamauchi Hiroshi, Hitomi Toshiaki, Takata Ayako	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of arsenic metabolism and tight junction injury after exposure to arsenite and monomethylarsonous acid using a rat in vitro blood-Brain barrier model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0295154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0295154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 人見敏明、高田礼子、山内博
2. 発表標題 Rat in vitro BBBモデルで評価した3価ヒ素暴露によるタイトジャンクション傷害
3. 学会等名 第94回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamauchi Hiroshi, Yoshida Takahiko, Takata Ayako	4. 発行年 2023年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 25
3. 書名 Arsenic in the Environment - Sources, Impacts and Remedies. Arsenic exposure and health effects: Differences by chemical structure, chemical form and arsenic methylation capacity.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山内 博  (YAMAUCHI Hiroshi)  (90081661)	聖マリアナ医科大学・医学部・教授    (32713)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	人見 敏明  (HITOMI Toshiaki)  (90405275)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授     (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関