

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19708

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた海産物中ヒ素摂取による脳機能障害に対する革新的評価法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative evaluation method using human iPS cells for brain dysfunction caused by marine arsenic compounds

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット初代培養細胞を用いたin vitro試験法において、血液脳関門(BBB)の成熟及び未成熟期を設定し、三酸化ヒ素(iAs(III))及び中間代謝物のモノメチル化ヒ素(MMA(III))をそれぞれ添加後6、24時間目にBBB機能を評価した。iAs(III)とMMA(III)はそれぞれ濃度依存的に酸化ストレス作用としてNrf2、HO-1を誘導し、これらの作用は添加後6時間目が24時間目に比べ顕著であった。Claudin-5を指標としてBBB機能をWB法と免疫染色にて評価した結果、成熟と未成熟期に共通して傷害が出現し、その作用はMMA(III)がiAs(III)に比較し強くなる傾向を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、ラット初代培養細胞を用いた試験方法において、BBB機能を成熟及び未成熟期に設定して無機ヒ素とその代謝物の暴露後におけるバリア機能への影響を評価可能とし、ヒトiPS細胞を用いたin vitro試験法への展開に必要な基礎情報を得た。本研究の成果は、グリア細胞へのサイトカインストームによる炎症反応からの神経細胞への障害を検証する技術として有益な可能性があり、現代社会における脳機能障害や認知機能障害に関する研究に貢献する社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In an in vitro method using rat primary culture cells, the blood-brain barrier (BBB) was set at the mature and the immature stages, and arsenic trioxide (iAs(III)) and the intermediate metabolite monomethylated arsenic (MMA(III)) were added to the cells respectively. The effects on the BBB were evaluated at 6 hours and 24 hours after exposure. iAs(III) and MMA(III) each induced Nrf2 and HO-1 in dose-dependent manner as oxidative stress effects. These effects were more pronounced at 6 hours than at 24 hours. The effect on the barrier function was evaluated by Western blot (WB) method and immunostaining using Claudin-5 as a marker. The injury appeared in both mature and immature stages of BBB, suggesting that MMA(III) had a stronger effect than iAs(III).

研究分野：衛生学

キーワード：無機ヒ素 モノメチル化ヒ素 血液脳関門 脳機能障害 in vitro BBBモデル iPS細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1980年以降、アジアや中南米諸国では自然由来無機ヒ素の飲料水汚染による慢性ヒ素中毒が大規模に発生し、WHOは約5,000-9,000万人の中毒患者とハイリスク者が存在すると推計している。中毒患者では皮膚角化症や発がん(皮膚がんや肺がん、膀胱がん)が認められ、さらに近年、小児の脳機能障害など新たな問題が懸念されている。近年、WHOや一般社会では生活習慣病の予防に魚介類や海藻類の摂取が推奨されている。しかし、魚介類や海藻類には高濃度のヒ素化合物(数十～数百ppm)が含有されており、それらのヒ素は無機ヒ素及び有機ヒ素化合物で健康影響が懸念されている。特に、血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)が未完全な胎児や乳幼児への海産物中ヒ素化合物の暴露は成人と異なる生体影響が推測され、詳細な研究が求められている。従来、有害化学物質暴露と発達障害、脳機能障害、次世代影響などの研究には動物実験が実施されている。最近、US-EPAや欧州動物実験代替法評価センターなどでは、動物実験に替わる*in vitro*試験の確立や実施などが提言されるが、実験的な検証研究の難しさが存在している。

2. 研究の目的

BBBが未完全な胎児や乳幼児への海産物中ヒ素化合物の暴露は成人と異なる生体影響が推測され、詳細な研究が求められる。しかし、当該問題は疫学研究から指摘されるも動物実験での検証は困難を極め、さらに、近年の動物保護の観点から動物実験に替わる*in vitro*試験法が望まれている。

本研究では、ヒトiPS細胞から分化誘導する血管内皮細胞や神経細胞などを用いたBBBモデルの構築に向けて、その基礎的な情報の収集を目的として、ラット初代培養細胞から作製するBBBモデルにて、成熟期と未成熟期を設定し、ヒ素暴露によるBBB機能への影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*試験でのBBBモデル

ラット初代培養細胞(PharmaCo-Cell Co. Ltd.)を用いて、脳毛細血管内皮細胞(内皮細胞)、周皮細胞(ペリサイト)及び星状神経膠細胞(アストロサイト)の3種類から構成されたBBBの成熟と未成熟モデルを構築した。経内皮電気抵抗(Transendothelial electrical resistance, TEER)基準値 $131\Omega \times \text{cm}^2$ 以上を成熟BBBモデル、それ以下を未成熟BBBモデルとした。

(2) 研究対象のヒ素化合物

三酸化二ヒ素(iAs^{III})、Sigma-Aldrich) 1-20 μM 、モノメチル化ヒ素(MMA^{III})、Toronto Research Chemicals) 0.1-2 μM にて実験を実施した。

(3) TEER測定とNaF透過性試験

TEER測定はカップ型電極EndOhm-6(WPI)にて測定した。NaF透過性試験は、ヒ素添加24h後にNaFの透過係数(Papp)を、37°Cで加温した10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaF溶液をインサートの血管側に添加し測定した。

(4) ウェスタンブロット(WB)法による評価

ヒ素化合物を暴露した内皮細胞とペリサイトをCellLytic M(Sigma-Aldrich)から全タンパク質を抽出した。NuPAGE gel(Thermo Fisher Scientific)にて電気泳動し、その後ポリフッ化ビニリデン膜(PVDF膜、Millipore)に転写後、Bullet Blocking One(Nacalai)でブロッキング反応を行い、Nrf2抗体(Abcam)、HO-1抗体(Proteintech)、Claudin-5抗体(Thermo Fisher Scientific)、ZO-1抗体(Thermo Fisher Scientific)およびインターナルコントロール β -actin抗体(Sigma-Aldrich)を一次抗体として反応させ、二次抗体(GE Healthcare)反応後、化学発光キット(GE Healthcare)で処理した。免疫反応性バンドをImage Quant LAS 4000(GE Healthcare)で検出し、バンド密度の定量化はImage J software(National Institutes of Health)にて行った。

(5) 免疫染色

ヒ素化合物を暴露した内皮細胞をアセトン・メタノール法で前処理後、3%BSA溶液でブロッキング反応を行い、Claudin-5抗体(Thermo Fisher Scientific)を一次抗体として反応させた。二次抗体(Alexa Fluor 488; Thermo Fisher Scientific)で反応後、DAPI核染色し、スライドガラス(Matsunami Glass)に水溶性蛍光用マウンティング剤(Thermo Fisher Scientific)で封入し、標本は蛍光顕微鏡(KEYENCE BZ-X710, Keyence)にて撮像した。

4. 研究成果

(1) TEER及びNaF透過性を指標としたBBB機能の評価

成熟及び未成熟期のBBBモデル細胞に対するヒ素暴露後のバリア機能への影響をTEER値により評価した結果、 iAs^{III} 及び MMA^{III} は共にバリア機能の低下が濃度依存的に認められ、 MMA^{III} が iAs^{III} に比較して強くなる傾向が示唆された。一方、NaF透過性を指標としてBBB機能の障害を評価した結果、2 μM の MMA^{III} は成熟期におけるBBB機能の障害が顕著であり、BBBのタイトジャ

ンクシオン構造への傷害が示唆された。なお、未成熟期では、細胞間タイトジャンクション形成が弱く、BBB 構造への傷害の程度は軽度になる傾向が観察された。

(2) Nrf2 及び H0-1 への影響評価

成熟及び未成熟期の BBB モデル細胞に対するヒ素暴露後の酸化ストレスタンパクの動態を WB 法により評価した。Nrf2 は iAs^{III} 及び MMA^{III} 暴露 6 時間目において濃度依存的に出現したが、24 時間目では出現は消失した。これに対して、H0-1 の誘導は成熟及び未成熟期群において iAs^{III} 及び MMA^{III} 暴露 6, 24 時間目でもそれぞれ顕著な出現を確認した。

(3) Claudin-5 及び ZO-1 を指標とした BBB バリア構造の評価

成熟及び未成熟期の BBB モデルにおけるヒ素暴露後の BBB 構造の傷害について、タイトジャンクション蛋白の動態を免疫染色および WB 法にて評価した。免疫染色にて評価した結果から、成熟期では Claudin-5 は細胞膜に明確に発現することを確認できた。これに対して、未成熟期は成熟期よりも Claudin-5 の細胞膜への局在が乏しいことが観察された。一方、成熟及び未成熟期 BBB モデル細胞への iAs^{III} 及び MMA^{III} の暴露により、Claudin-5 の発現に影響が生じることを確認した (図 1)。なお、ZO-1 の発現動態について、Claudin-5 に比較してヒ素暴露による影響が弱い傾向が示唆された。

(4) まとめ

無機ヒ素暴露からの脳機能障害について中毒事例や疫学調査の知見を証明する動物実験はない。BBB 機能の役割としてタイトジャンクション構成分子は重要であり、そのなかで Claudin-5 は中核を担うと考えられている。本研究から、成熟及び未成熟期の BBB モデル細胞に対する無機ヒ素暴露後の Claudin-5 は明確に傷害を受けることが確認された。このことは、無機ヒ素暴露による BBB 機能を維持するタイトジャンクション構造の傷害を確認した結果でもあり、脳実質細胞 (グリア細胞、神経細胞) への影響も予測される。ラット初代培養細胞から構築した BBB モデルによる実験情報から、ヒト iPS 細胞作製及び必要性の意義は高まり、将来的に動物実験の代替法への進展が期待される実験結果の一部を証明した研究と考える。

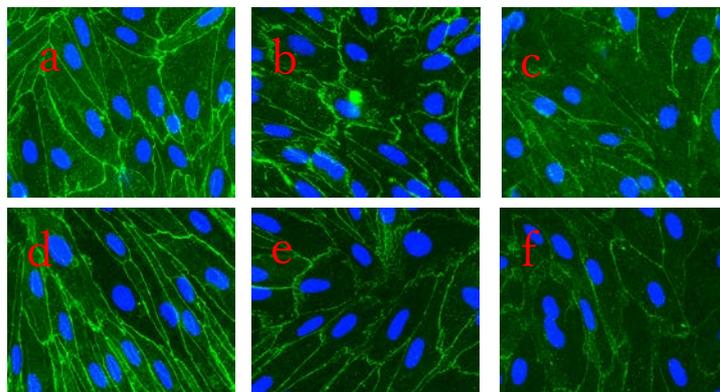


図 1 成熟及び未成熟期 BBB における iAs^{III} -20 μ M, MMA^{III} -2 μ M 添加後の Claudin-5 の発現動態.

- a. 成熟期の対照群; b. 成熟期の iAs^{III} -20 μ M 添加群; c. 成熟期の MMA^{III} -2 μ M 添加群; d. 未成熟期の対照群; e. 未成熟期の iAs^{III} -20 μ M 添加群; f. 未成熟期の MMA^{III} -2 μ M 添加群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Hiroshi Yamauchi, Ayako Takata	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 11
3. 書名 Arsenic Contamination in Asia: Past and current arsenic poisonings	

1. 著者名 Yang Cao, Ayako Takata, Toshiaki Hitomi, Hiroshi Yamauchi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 18
3. 書名 Arsenic Contamination in Asia: Metabolism and toxicity of organic arsenic compounds in marine organisms	

1. 著者名 Hiroshi Yamauchi, Ayako Takata, Yang Cao, Koichiro Nakamura	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 13
3. 書名 Arsenic Contamination in Asia: The development and purposes of arsenic detoxification technology	

〔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	人見 敏明 (HITOMI Toshiaki) (90405275)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授 (32713)	

6. 研究組織（つづき）

	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	曹 洋 (CAO Yang) (70793751)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教 (32713)	
研究協力者	山内 博 (YAMAUCHI Hiroshi) (90081661)	聖マリアンナ医科大学・医学部・客員教授 (32713)	