

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651062

研究課題名(和文)胎児期血液脳関門の構築および機能に対する環境化学物質の影響の解析

研究課題名(英文)Effects of Environmental Chemicals on Fetal Blood Brain Barrier

研究代表者

宮崎 航(Miyazaki, Wataru)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：90512278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：環境化学物質の中樞神経系に対する影響は直接これらの物質が神経系細胞に作用することによって引き起こされると考えられているが、これらの物質の脳への移行やその移行を司る血液脳関門(BBB)に対する影響は未だ不明である。本研究はBBBに対する化学物質影響について、BBBの*in vitro*構築モデルを用いて検証した。ダイオキシンを曝露した結果、ダイオキシンがBBBを容易に通過し、用量依存的に薬物代謝酵素の発現が増加していることを認めた。また、曝露により、BBBの透過性が亢進していることを認めた。これらの結果から環境化学物質の一部は神経系に直接作用するだけでなく、BBBにも影響を及ぼすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Environmental chemicals cause several adverse effects on developing brain of fetus. These effects may be caused by direct action of the chemicals to neural cells, but also there is a possibility that the effects are caused by indirect action of them, for example through disruption of blood brain barrier: BBB. In this study, we used *in vitro* model of BBB and analyzed the effects of the chemicals on BBB using dioxin as model chemical. The exposure of dioxin caused a distraction of BBB permeability in dose dependently. Moreover, dioxin easily passed through BBB and increased the expression of drug metabolizing enzyme; CYP. These results suggested that BBB disruption were caused by environmental chemicals, dioxin, and the adverse effects might cause abnormal brain development.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境化学物質 血液脳関門

### 1. 研究開始当初の背景

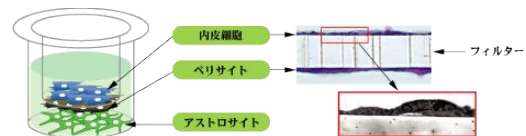
ダイオキシンなど環境化学物質の母体を介した胎児期・授乳期低用量曝露がヒトや野生動物の脳機能に影響を及ぼすことが示されている(Jacobson JL et al *N Engl J Med.*など)。これらの影響は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) が未熟である時期に、化学物質が胎児・新生児の脳内へ容易に移行し、神経系細胞へ直接作用しているためと考えられている。BBB は血液と脳と間での物質交換を制限し、脳を守る機構である。これまで、ダイオキシン曝露による白血球の脳側への侵入シグナル (Icam-1) の発現上昇が報告されている (Vorderstrasse BA et al. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001)。近年、BBB の構造は胎生 15 日(E15)までに基本的な構造が構築され、脳保護の機能を有していることが報告された (Daneman R et al. *Nature* 2010)。このことから、環境化学物質が胎児期から新生児期において神経系細胞へ直接作用するだけでなく、BBB の構造・機能に変化を及ぼすことにより脳への影響が引き起こされる可能性が示唆されるが、環境化学物質の BBB への作用はほとんど検証されていない。

### 2. 研究の目的

これまで申請者らが脳機能障害を認めたダイオキシン曝露モデル (E12.5 に母体に経口曝露し、生後 21 日までの経母体・母乳曝露) では、BBB の状態が、【受精後～E15 までの BBB 形成前】、【E15～出生までの BBB 基本構造形成】、【出生後の BBB 成熟期】の 3 段階が存在する。本研究では特に出生前 BBB の構築と機能に対する化学物質影響について、実験動物を用いた解析ならびに BBB *in vitro* 試験モデルを用いた分子レベルでの詳細な解析を行い、その変化が脳発達・機能に影響を及ぼす一因となるか検証を進め、環境化学物質の新たな作用機序・概念を作り出すことを目指す。

### 3. 研究の方法

これまで申請者は E12.5 より TCDD 曝露された E13.5 の子動物からトランスサイトーシス関連の遺伝子の発現減少を見出した (未公表知見)。そこで BBB 機能解析を進めるに当たり、ファーマコセル株式会社より発売されている薬物移行性の解析に用いられている血液脳関門 *in vitro* モデル BBB キットに注目した。このキットには脳血管内皮細胞、周細胞 (ペリサイト)、アストロサイトが利用され、生体での BBB を再現している。上部 (内皮細胞より上側) を血管内腔側、下部 (ペリサイトの下側) を脳内側とし、上部から下部へ (血管内腔から脳内へ) の薬物の移行をそれぞれの培養液内の薬物量を測定することにより BBB 機能を検証するものである (下図)。



このモデルは BBB 構築開始から 4 日で BBB のバリアー機能を有し、透過抵抗性および物質輸送選択性を示す。この過程においてダイオキシン (2,3,7,8-tetra chloro dibenzo-p-dioxin) をモデル化学物質として曝露し、その曝露影響の検証を行った。

#### (1) ダイオキシン透過性の確認

曝露したダイオキシンが BBB を通過しているかを検証するため、用量依存的にダイオキシンを曝露し、アストロサイトにおいてダイオキシンにより誘導される薬物代謝酵素の発現量をもとに移行量を推定した。

#### (2) BBB バリアー機能の測定

BBB キットにおいて、BBB 構築開始時からの曝露 (構築開始 1 日後) BBB 構築後からの曝露 (構築開始 4 日後) にわけ、ダイオキシンの曝露を行い、BBB のバリアー機能 (物質透過性) を Trans Epithelial Electric Resistance (TEER) を測定することにより評

価した。

### (3) ダイオキシンの作用部位の推定

ダイオキシン曝露によって認められた BBB の機能変化について、BBB を構成する分子 (claudin 5、occludin など) の発現についてウエスタンブロット法を用いて検証した。

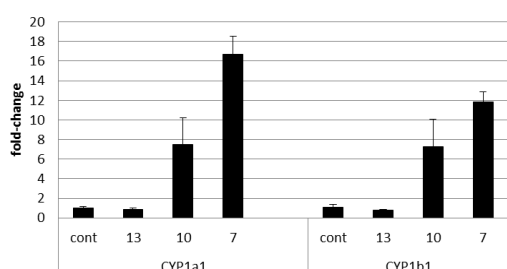
### (4) 他の化学物質を用いた BBB 機能解析試験

上記の研究をもとに、他の環境化学物質、ビスフェノール A、ニコチンを曝露した時の変化についても検証した。これらの結果を TCDD 曝露群と比較し、それぞれの化学物質曝露時の影響の違いを観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ダイオキシンの透過性

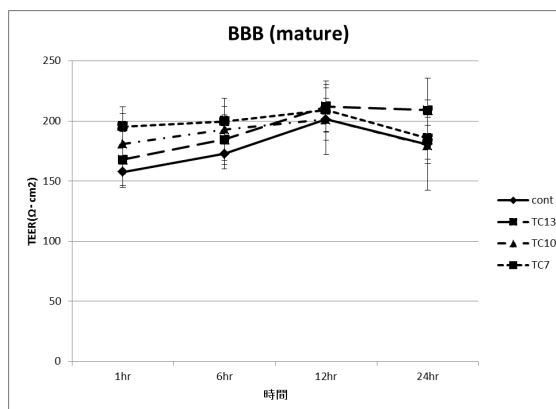
曝露したダイオキシンが BBB を通過しているかについて、ダイオキシンにより誘導される薬物代謝酵素 CYP1A1 および CYP1B1 の遺伝子発現を指標とし、BBB の脳側にあるアストロサイトにおけるこれらの発現を定量的リアルタイム PCR 法にて検証した。その結果、どちらの遺伝子もダイオキシン曝露用量依存的に発現が亢進していることが認められた (下図)。



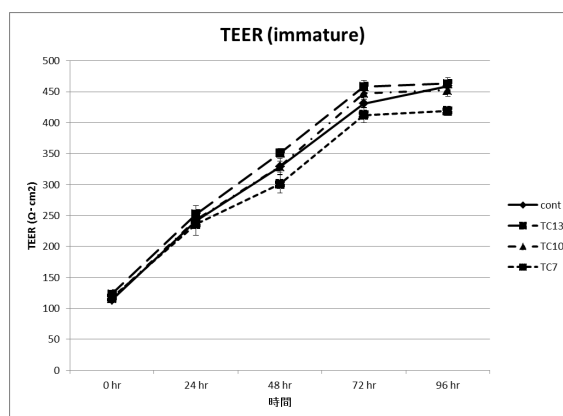
### (2) BBB バリアー機能の測定

BBB 構築過程において、ダイオキシンの曝露をそれぞれ構築中と構築後に分け、BBB の物質透過性について TEER の測定を行い、BBB におけるダイオキシン曝露の影響を検証した。まず、BBB 構築完了後に TEER を測定し、バリアー機能を有していることを確認した後にダイオキシンを曝露し、TEER を測定した。そ

の結果、ダイオキシン曝露による TEER の有意な変化は認められなかった。



一方、BBB 構築開始 1 日後から構築完了の 4 日目までダイオキシンを曝露し、構築過程における TEER の変化について測定した。その結果、ダイオキシンの用量依存的に TEER 地の有為な減少、つまり、BBB のバリアー機能の減少 (透過性の亢進) が認められた。



### (3) ダイオキシン作用部位の推定

TEER 値の減少が認められたことから、TEER と相関するタイトジャンクション構造における claudin 5、occludin の発現について検証した。その結果、どちらの発現についても曝露による減少が認められた。

### (4) 他の化学物質を用いた BBB 機能解析試験

上記の結果からビスフェノール A ならびにニコチンを用いて、BBB 構築過程にこれらを曝露し、BBB 機能に対する影響を検証した。その結果ビスフェノール A 曝露による TEER の変化は認められなかったものの、ニコチン

曝露においては TEER の減少を認めた。

(5) まとめ

以上の結果から、ダイオキシンをはじめとする化学物質の曝露が BBB 機能やその構築に影響を及ぼすことを認めた。これらのことから、化学物質の中樞神経系に対する影響は神経系に直接作用するだけでなく、BBB の機能をかく乱することにより間接的に引き起こされる可能性が示唆された。

本研究の成果は、これまで主に検証されてきた化学物質の神経系に対する直接作用による影響とは異なる経路により引き起こされるという新たな概念を示すものである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumadai-public.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 航 (MIYAZAKI, Wataru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 90512278

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: