

平成11年度厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）  
（分担）研究報告書

血液脳関門及びグリア細胞への影響のin vitro評価  
（主任）研究者 加藤 泰治 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

内分泌かく乱物質（EDCs）の血液脳関門（blood-brain barrier:B-BB）への影響を検討するにあたり、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不死化を行った。また、B-BBで水チャネルとして重要と考えられているAquaporin-4（AQP4）のウシcDNAのクローニングを行った。EDCsが、B-BBを構成する細胞の遺伝子発現を変化させるかどうか基礎的な情報を得るために、ヒト脳毛細血管内皮細胞において、DNA micro array法を使い、estrogenによる遺伝子発現の変化を検討した。また、アストロサイトについては、estrogen および一部のEDCsを作用させたときのAQP4の発現変化を調べたところ、約2倍に増加した。

加藤泰治・名古屋市立大学医学部分子医学研究所生  
体制御部門・教授

A. 研究目的

血液脳関門（blood-brain barrier:B-BB）は脳への物質の移行を制限し、中枢神経系の恒常性を維持する機構として知られている。内分泌かく乱物質（EDCs）の中枢神経系への影響を検討するにあたって、EDCsがB-BBをどの程度通過しうるか、そして、EDCsがB-BBそのものの特性を変化させるものか、把握しておく必要がある。申請者らは、すでに、ウシ脳毛細血管内皮細胞(BBEC)とラットアストロサイトを共培養することにより、培養系を利用したB-BBモデル（in vitro B-BBモデル）を確立しているが、脳毛細血管内皮細胞の採取は難しく、今後、実験を進めるにあたって、脳毛細血管内皮細胞を安定供給する必要がある。今年度は、ウシ脳毛細血管内皮細胞の不死化を行い、in vitro B-BBモデルに利用できるかどうか検討した。また、B-BBで水チャネルとして重要と考えられているAquaporin-4（AQP4）のウシcDNAのクローニングを行った。一方、EDCsが、B-BBを構成する細胞の脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの遺伝子発現を変化させるかどうか基礎的な情報を得るために、ヒト脳毛細血管内皮細胞において、DNA micro array法を使い、estrogenによる遺伝子発現の変化を検討した。また、アストロサイトについては、Estrogen および一部のEDCsを作用させたときにAQP4の発現がどのように変化するか検討した。

B. 研究方法

- 1, ウシ脳毛細血管内皮細胞(BBEC)の不死化  
すでに申請者らが確立している方法でウシ脳より単離したBBECに、SV40 large T 抗原を発現するプラスミドpSV3-neoをリン酸カルシウム共沈法にて導入した。Neomycin（400 $\mu$ g/ml）によりselectionを行った。得られたクローンの中より、脳毛細血管内皮細胞の特性、（1）高アルカリフォスファターゼ（ALP）活性、（2）紡錘状の形態、（3）Ac-LDLの取り込み、（4）Tight-junction様構造、（5）multi-drug resistance gene およびglucose transporter 1の発現 を示すものを選択した。
- 2, 方法1で得られたクローンt-BBEC-117細胞についてラットアストロサイトの条件培地および既知のアストロサイト産生因子（bFGF、VEGF、IL-6、GDNF）が、上記の脳毛細血管内皮細胞の特性をさらに誘導するか検討した。
- 3, ウシAquaporin-4遺伝子のクローニング  
ウシ脳cDNA Libraryをスクリーニングし、AQP4 cDNAをクローニングした。5'側にalternative splicingが存在することが分かったので、genomic DNAを使い、alternative splicing部位のexon-intron boundaryについても検討した。
- 4, ヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現のmicro arrayによる検索  
ヒト脳毛細血管内皮細胞を大日本製薬社より購入、2回継代後に、estrogen  $1 \times 10^{-12}$ を24時間作用させ、作用させていないコントロール細胞とともにRNAを抽出、GenomeSystem社に解析を依頼し

た。

5, EDCsがラットアストロサイトにおけるAQP4遺伝子発現に与える影響

ラットアストロサイトを胎齢18日の胎仔より培養し、1回継代後に培養液中にEstrogen ( $1 \times 10^{-9}$ )、ビスフェノール ( $1 \times 10^{-9}$ )、4-ノニルフェノール ( $1 \times 10^{-9}$ )、フタル酸ジイソノニル ( $1 \times 10^{-9}$ ) を6時間作用させた後、RNAを抽出した。RT-PCRにて、AQP4 mRNAの発現量の変化を検討した。

### C. 研究結果

1, BBECの不死化を行ったところ、42クローンを得ることができた。そのうちt-BBEC-117細胞は、

(1) 高アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、  
 (2) 紡錘状の形態、 (3) Ac-LDLの取り込み、  
 (4) Tight-junction様構造、 (5) multi-drug resistance gene および glucose transporter 1の発現を示し、脳毛細血管内皮細胞の特性を有していることが判明した。そこで、以降は、このt-BBEC-117を用いて実験を進めた(Fig. 1A)。

2, ラットアストロサイトの条件培地および既知の

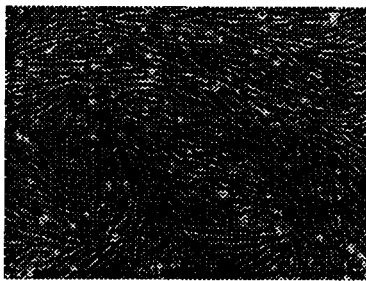


Figure 1A. t-BBEC-117 顕像

アストロサイト産生因子 (bFGF、VEGF、IL-6、GDNF) をt-BBEC-117に作用させ、ALP活性の変化およびL-glucoseの透過性の変化を観察したところ、bFGFでもってALP活性の上昇、L-glucoseの透過性の低下が観察された。ラットアストロサイトの条件培地中にもbFGFは含まれていることから、bFGFによってt-BBEC-117の脳毛細血管内皮細胞としての特性がより強く誘導されることが分かった。また、t-BBEC-117とアストロサイトを共培養することにより、L-glucoseのpermeabilityが低下した(Fig. 1B)。

3, ウシAQP4 cDNAをクローニングしたところ、2種類のmRNAが存在することが分かり、long formは323アミノ酸をコードし、short formは、301アミノ酸をコードしていた。アミノ酸レベルでヒト、ラット、マウスと93%以上の相同性があった(Fig. 2)。また、genomic DNAを使って、exon-intron boundaryを検討したところ、5'側の2つのexonが、別々に使用されて転写が開始されていることが判明した。

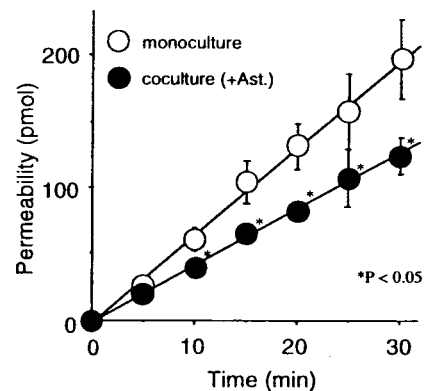


Figure 1B. L-glucose permeability

bovine	<u>MSDR</u> PAATRWGKCCPLICTRESIMVAFKGVWTFWKA <sup>*</sup> YAEFLAHLIFVILSLGSTINWGGAEHPLPVDMLVLSLFCFLSIATMVQCFGHISGGHINPAY	100
human	MSDRPTAERWGGCCPLICTRENIMVAFKGVWTFWKA <sup>*</sup> YAEFLAHLIFVILSLGSTINWGGTEHPLPVDMLVLSLFCFLSIATMVQCFGHISGGHINPAY	
rat	MSDGAAERWGGKCCPRICRESIMVAFKGVWTFWKA <sup>*</sup> YAEFLAHLIFVILSVGSTINWGGSEHPLPVDMLVLSLFCFLSIATMVQCFGHISGGHINPAY	
mouse	MSDGAAERWGGKCCPRICRESIMVAFKGVWTFWKA <sup>*</sup> YAEFLAHLIFVILSVGSTINWGGSEHPLPVDMLVLSLFCFLSIATMVQCFGHISGGHINPAY	
bovine	TVAMVCTRHSIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLTPPSVVGGLGVTVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSJALAI <sup>†</sup> GSVAIG	200
human	TVAMVCTRHSIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLTPPSVVGGLGVTVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSJALAI <sup>†</sup> GSVAIG	
rat	TVAMVCTRHSIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLTPPSVVGGLGVTVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSJALAI <sup>†</sup> GSVAIG	
mouse	TVAMVCTRHSIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLTPPSVVGGLGVTVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSJALAI <sup>†</sup> GSVAIG	
bovine	HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNW <sup>‡</sup> ENHWIYVWGP <sup>‡</sup> IGAVLAGGLYEWFCDV <sup>‡</sup> ELKRR <sup>‡</sup> KEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQVET <sup>‡</sup> EDLILKPGVVH	300
human	HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNW <sup>‡</sup> ENHWIYVWGP <sup>‡</sup> IGAVLAGGLYEWFCDV <sup>‡</sup> ELKRR <sup>‡</sup> KEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQVET <sup>‡</sup> EDLILKPGVVH	
rat	HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNW <sup>‡</sup> ENHWIYVWGP <sup>‡</sup> IGAVLAGGLYEWFCDV <sup>‡</sup> ELKRR <sup>‡</sup> KEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQVET <sup>‡</sup> EDLILKPGVVH	
mouse	HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNW <sup>‡</sup> ENHWIYVWGP <sup>‡</sup> IGAVLAGGLYEWFCDV <sup>‡</sup> ELKRR <sup>‡</sup> KEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQVET <sup>‡</sup> EDLILKPGVVH	
bovine	VIDIDRGEKKGKDSGEVLSSV	323
human	VIDIDRGEKKGKDSGEVLSSV	
rat	VIDIDRGEKKGKDSGEVLSSV	
mouse	VIDIDRGEKKGKDSGEVLSSV	

Figure 2. Comparison of amino acid sequence of bovine AQP4 with those of human rat, and mouse AQP4. Open squares indicate residues in the human, rat, and mouse sequences that are identical to those in the bovine sequence. Two potential initiation sites, Met1 and Met23, are indicated by asterisks and two sites of NPA motif are underlined.

4, ヒト脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現を micro array で検索したところ, estrgen receptor の発現がほとんどなく, estrogen related receptor が多く発現していることが判明した。

5, ラットアストロサイトに estrogen, ビスフェノール, 4-ノニルフェノール, フタル酸ジイソノニルを作用させたところ, 6時間後の時点で, どの試薬においても AQP4 mRNA の発現量は約2倍に増加した。

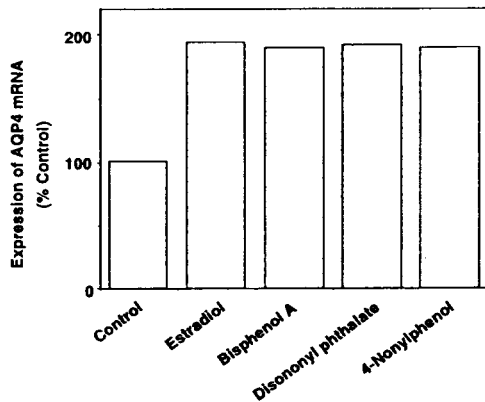


Figure 3. Expression of AQP4 mRNA stimulated by EDCs

#### D. 考察

1, ウシ脳毛細血管内皮細胞を不死化して得られた t-BBEC-117 は脳毛細血管内皮細胞としての特性を有しており, 今後 in vitro B-BB モデルに利用することができると考えられた。今後は, この細胞を利用し, EDCs の B-BB に与える影響を詳細に検討したい。

2, ヒト脳毛細血管内皮細胞は estrogen related receptor を多く発現していることが判明した。EDCs が, この receptor を介して作用している可能性もあり, 今後の検討課題と考えられた。

3, B-BB を構成するもう一つの細胞であるアストロサイトについて, 水チャネルである AQP4 の発現が estrogen および ビスフェノール, 4-ノニルフェノール, フタル酸ジイソノニルで変化することが分かり, EDCs が B-BB の機能を変化させる可能性が示唆された。今後 microarray 法などを用い, estrogen および EDCs による遺伝子発現変化を検討していきたいと考えている。

#### E. 結論

1, 不死化ウシ脳毛細血管内皮細胞株を樹立し, 今後の安定供給が可能となった。

2, ウシ AQP4 の cDNA をクローニングした。

3, EDCs により, 脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトの遺伝子発現が変化することが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., Kato, T. Induction of Blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35(1999)155-164.

2. Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Fujita, K., Miura, Y., Asai, K., Tsuda, T., Katsuya, H., Kato, T. Molecular cloning of two bovine aquaporin-4 cDNA isoforms and their expression in brain endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1489(1999)389-394.

3. Yoneda, K., Yamamoto, N., Asai, K., Sobue, K., Fujita, Y., Fujita, M., Mase, M., Yamada, K., Tada, T., Miura, Y., Kato, T. Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. (Submitted).

##### 2. 学会発表

1. Yamamoto, N., Sobue, K., Yoneda, K., Miura, Y., Asai, K., and Kato, T.

Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. Society for Neuroscience 29th Annual Meeting October 23-28, 1999, Miami Beach, U.S.A.

2. 山本直樹, 祖父江和哉, 米田和広, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治

アストロサイト産生因子による血液脳関門形質発現の誘導

第42回日本神経化学会 1999.9.15.-17. 広島

3. 山本直樹, 祖父江和哉, 米田和広, 三浦 裕, 浅井清文, 加藤泰治

血液脳関門形成を促すアストロサイト産生因子の同定

第63回日本生化学会中部支部例会 1999.5.14. 三重