

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17266

研究課題名（和文）PFASs曝露によるヒト胎児の神経発達への影響評価

研究課題名（英文）The effects of PFASs on neural differentiation

研究代表者

藤原 悠基 (Fujiwara, Yuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20881220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：有機フッ素化合物類(PFASs)は、熱・化学的安定性等の物性を示すことから、消化剤等の幅広い用途で使用されている。この有機フッ素化合物の一種であるパーフルオロオクタンサルホン酸 (PFOS) は構造の安定性から高い蓄積性を持ち様々な毒性を持つことが示唆されている。本研究は神経発達毒性に着目し、甲状腺ホルモンを介した神経発達への影響および血液脳関門への影響を検証した。その結果、PFOSによる樹状突起形成阻害が甲状腺ホルモン変換酵素であるD2を介した影響であることを示した。また、血液脳関門については高用量曝露時に影響を及ぼす可能性が示されたが脳内への移行については輸送体等を介した影響が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その化学的な安定性から蓄積性が高く様々な影響が示唆されるPFASの一種であるPFOSは様々な毒性影響を持つことが示唆されており、その一つが神経発達毒性である。しかし、*in vivo*および疫学研究から神経発達毒性への影響が示唆されていたがそのメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、甲状腺ホルモン変換酵素を介した毒性影響により神経発達に重要である樹状突起形成を阻害する可能性を報告した。この報告はPFOS曝露による甲状腺ホルモン系を介した毒性影響メカニズムの一端に迫る重要な報告である。

研究成果の概要（英文）：Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) are used in a wide range of applications, such as surfactants, due to their thermal and chemical stability. One type of these organic fluorine compounds, perfluorooctane sulfonate (PFOS), is known for its structural stability, high bioaccumulation potential, and various toxicities. This study focused on the neurodevelopmental toxicity of PFOS, specifically examining its impact on neurodevelopment mediated by thyroid hormones and its effects on the blood-brain barrier. The results indicated that PFOS inhibits dendritic formation through effects mediated by the thyroid hormone converting enzyme, deiodinase 2 (D2). Additionally, while high-dose exposure to PFOS may impact the blood-brain barrier, its transport into the brain might be influenced by specific transporters.

研究分野：神経発達毒性学

キーワード：PFAS neuron 甲状腺ホルモン 血液脳関門

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有機フッ素化合物類(PFASs)は、熱・化学的安定性等の物性を示すことから、撥水撥油剤、界面活性剤、金属メッキ処理剤、殺虫剤、および調理器具のコーティング剤等の幅広い用途で使用されている。この有機フッ素化合物の一種であるパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)やパーフルオロオクタン酸(PFOA)は構造の安定性から自然界で分解されにくく高い蓄積性を持つ点が問題視されており、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約(POPs条約)」で規制対象に指定されている。日本の河川におけるPFASsの検出状況は低下傾向にあるが申請者が住む群馬県においてもPFOS(1.0ng/L)、PFOA(1.6ng/L)が検出されている(令和元年度環境省調査資料)。PFOSはその蓄積性から毒性が問題視される点があるが、その中でも次世代への曝露影響に注意すべきである。申請者が所属する研究室における先行研究では、母マウスへのPFOS曝露により、仔の学習と記憶に影響を及ぼすことを報告している(Abdallah Mshaty et al., Food Chem Toxicol 2020)。しかし、PFOSの作用メカニズムは、甲状腺ホルモンを介した影響(Min, H.; et al. Mol Neurobiol 2016)、活性酸素種(ROS)による可能性が指摘されている(Sun P et al., Neurotoxicol Teratol 2019)が明らかではない。さらに、PFOS曝露によるヒトへの影響は急性毒性を含めて明らかではない。そこで申請者は当研究室での神経系への報告に加えて、動物においてPFOSが血液脳関門(BBB)を破綻させる可能性がある報告(Yongquan Yu et al., 2020)に加えて脳サンプルからPFOSが経時的に増加傾向となること(Itaru Sato et al., J. Toxicol. Sci. 2009)を根拠に、PFASsによる脳神経系への曝露影響を検証する必要があると考え、PFASsによる神経発達による影響およびBBBへの影響について検討を行った。

### 2. 研究の目的

PFASsの周産期曝露による胎児脳神経系の発達、発育への影響とその機序を明らかにすることを目的し、特に甲状腺ホルモンを介した神経発達およびBBBへの影響について検証を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1-1) ラット初代培養小脳プルキンエ細胞を用いた樹状突起形成への影響

ラット脳代培養小脳プルキンエ細胞を用いて、樹状突起形成に対する甲状腺ホルモンを介したPFASsの影響を検証するため、出生後2日目のラットを麻酔下において小脳を摘出し小脳細胞(ニューロン、アストロサイトを含む)をポリ-L-リジンでコーティングを行ったチャンバースライドに播種した。1日後、T3、T4およびPFOSの曝露を行い、インキュベーター(37℃、5%CO<sub>2</sub>)内で17日間培養を行った。その後、カルピンジンをを用いた免疫組織化学染色を行い、形態解析を行った。さらに、細胞増殖アッセイを行い細胞死への毒性影響についても検討を行った。

#### (1-2) PFOS曝露によるD2活性への影響

初代培養小脳細胞内にもD2を発現するアストロサイトが含まれているが、その数が少なくD2活性が検出限界以下であったため、ラットグリア芽腫由来であるC6細胞を用いて実験を行った。実験方法については標識されたヨウ素を用いて脱ヨウ素化活性を評価した(詳細は、Fujiwara, Y., et al. Int J Mol Sci 2023)。

#### (2) BBBモデルを用いたBBB透過性ならびに機能への影響

名古屋市立大学薬学部坂下真大先生よりご提供いただいた、ヒトiPS細胞由来in vitro BBBモデルにPFOSおよびPFOAを $10^{-8}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-4}$ Mで曝露を行い、上皮細胞のバリア機能の評価指標である、経上皮電気抵抗(TEER)の測定を曝露開始から0、1、3、6、12、24時間後に測定を行った。TEER測定後、ルンファーマーイエローを用いた傍細胞透過性試験を行い、さらに、iPS細胞由来脳血管内皮細胞(iBMEC)を回収しウエスタンブロッティングを行い、バリア機能を維持しているタイトジャンクションを構成するタンパク質であるZo-1、Claudin-5の確認を行った。

### 4. 研究成果

#### (1-1) PFOSは甲状腺ホルモンを介して樹状突起形成を阻害する

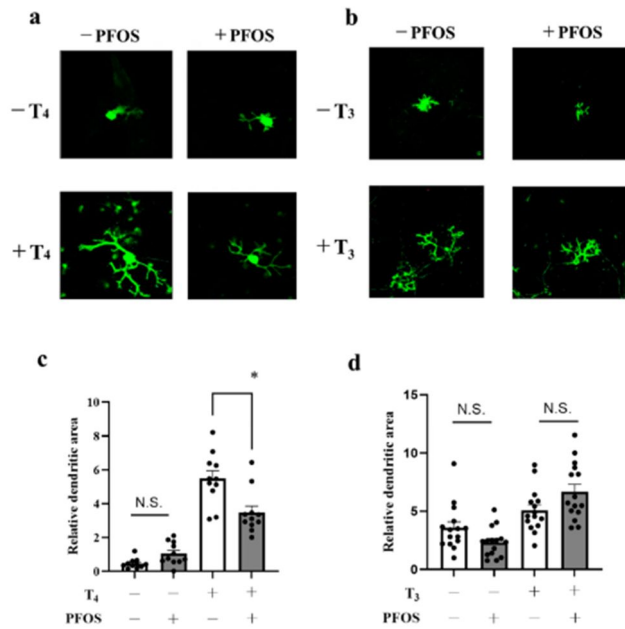
PFOS曝露・非曝露群、T3/T4の添加、非添加群で実験を行った結果、プルキンエ細胞はT4およびT3の非添加群においては全て樹状突起形成が行われず、T3およびT4のみの添加群では樹状突起は形成された(図1)。これは、樹状突起形成において甲状腺ホルモンがその形成において重要な働きをすることを示している。PFOSとT4の共曝露群においては樹状突起の形成が阻害される結果が得られた(図1)。しかし、T3とPFOSの共曝露群においてはPFOS非曝露群と比較して樹状突起の形態的な変化は認められなかった。以上の結果からT4からT3に変換する酵素であるD2を介した毒性影響によりプルキンエ細胞の樹状突起形成が阻害される可能性が示唆された。

#### (1-2) D2活性はPFOSにより抑制される

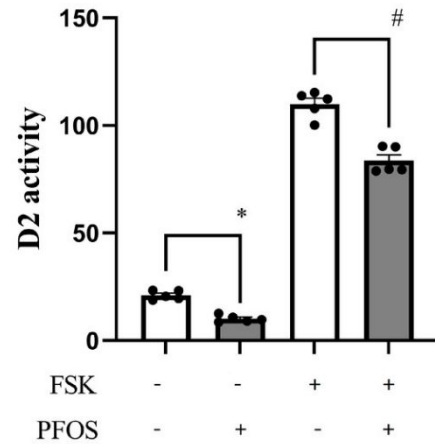
PFOS曝露によるアストロサイトのD2活性への影響を検証するためC6細胞を用いて実験を行った。その結果、D2活性を促すフォルスコリンの添加、非添加に関わらずPFOSが曝露されること

により、D2 活性が抑制される結果が得られた (図 2)。この結果から、(1 - 1) で得られた樹状突起形成阻害は PFOS が D2 活性を抑制することで T<sub>4</sub> が T<sub>3</sub> に変換されず、T<sub>4</sub> のみが存在することとなり T<sub>3</sub> のように強い活性を持たないために得られた結果であることが示唆された。

(図 1)



(図 2)

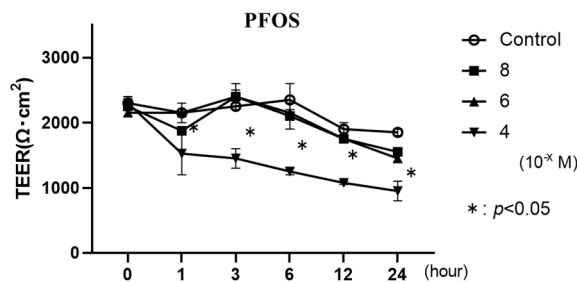


Fujiwara, Y., et al. Int J Mol Sci 2023

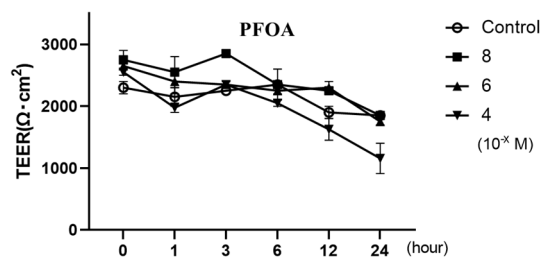
(2)PFOS, PFOA 高用量曝露時は BBB バリア機能に影響を及ぼす可能性がある

BBB バリア機能の指標として TEER、傍細胞透過性試験を行った。TEER は 10<sup>-4</sup>M の PFOS 曝露では時間経過でコントロール群と比較して有意に低下する結果が得られた (図 3)。しかし、その他の PFOS 曝露群および PFOA のすべての曝露群では有意な変化は得られなかった (図 4)。タイトジャンクション機能を確認するルシファーイエローを用いた傍細胞透過性試験においては PFOS, PFOA 共に 10<sup>-4</sup> M 曝露群においては有意な Pe の上昇を認めた (図 5)。以上より、PFAS 曝露によるタイトジャンクション機能の低下は高用量曝露時に起こる可能性がある。現在ヒトが曝露されている濃度の PFAS 脳内移行についてはトランスポーター等を介した影響である可能性が示唆された。

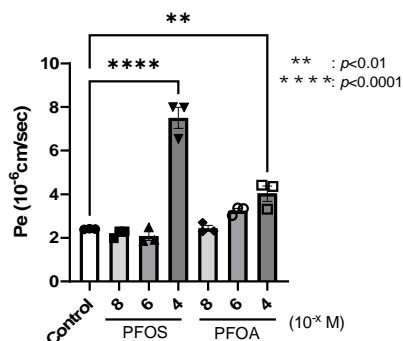
(図 3)



(図 4)



(図 5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiwara Yuki, Miyasaka Yuhei, Ninomiya Ayane, Miyazaki Wataru, Iwasaki Toshiharu, Ariyani Winda, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Perfluorooctane Sulfonate on Cerebellar Cells via Inhibition of Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12765 ~ 12765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241612765	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 -

1. 著者名 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Suzuki Hiraku, Fujiwara Yuki, Haijima Asahi, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 74
2. 論文標題 Lactational exposure to perfluorooctane sulfonate remains a potential risk in brain function of middle-aged male mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-024-00907-6	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 -

1. 著者名 Ninomiya Ayane, Mshaty Abdallah, Haijima Asahi, Yajima Hiroyuki, Kokubo Michifumi, Khairinisa Miski Aghnia, Ariyani Winda, Fujiwara Yuki, Ishii Sumiyasu, Hosoi Nobutake, Hirai Hirokazu, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 159
2. 論文標題 The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 112751 ~ 112751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2021.112751	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原悠基、天野出月、宮崎航、鯉淵典之
2. 発表標題 PFAS曝露による血液脳関門への影響
3. 学会等名 第94回日本衛生学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤原悠基、二ノ宮彩音、天野出月、橋本智仁、坂下真大、佐藤寛之、鯉淵典之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来BBBモデルを用いたPFAS曝露による血液脳関門への影響評価
3. 学会等名 第51回日本毒性学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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

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