

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25281033

研究課題名(和文)胎児期～小児期における有機臭素系難燃剤曝露が肥満症に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Study on the effects of development exposure to organic brominated flame retardants on obesity.

研究代表者

柳澤 利枝 (Yanagisawa, Rie)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：70391167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症に対する臭素系難燃剤(BFRs)曝露の影響について、肥満症マウスモデルを用いて検討した。その結果、decabromodiphenyl ether(decaBDE)の小児期～成人期曝露は、糖代謝のかく乱を介し肥満マウスの高血糖を亢進した。また、hexabromocyclododecane(HBCD)の胎児期～小児期曝露により、雌仔の肥満マウスの血糖値が上昇した。脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いた検討では、decaBDEあるいはHBCD曝露により濃度依存的にCCL2/MCP-1、TNF- α の産生が増加した。以上より、BFRsの低用量曝露は肥満症の病態を亢進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Brominated flame retardants (BFRs) are widely used in many consumer products and have been found as environmental pollutants. Although BFRs can disrupt the endocrine, nervous and immune systems, the association between BFRs and obesity remains unclear. Thus, our current study investigated the effects of exposure to BFRs from fetal to adult using obese mouse model. As are results, 1) exposure to decabromodiphenyl ether (decaBDE) from childhood to adult enhanced diet-induced hyperglycemia through disruption of glucose homeostasis, 2) in utero and lactational exposure to hexabromocyclododecane (HBCD) facilitated diet-induced hyperglycemia in female offspring, but not male offspring, and 3) exposure of BFRs (decaBDE or HBCD) in the co-culture system of macrophages and adipocytes increased the production of CCL2/MCP-1 and TNF- α in a dose-dependent manner. From our study, it is suggested that exposure to low doses of BFRs may enhance obesity-related health problems

研究分野：環境毒性学

キーワード：肥満症 難燃剤 小児・次世代影響 内分泌かく乱

1. 研究開始当初の背景

近年における肥満症急増の原因としては、食生活の変化、運動不足、ストレスなどの生活環境の変化に起因するものが大きいと言われている。一方、環境化学物質への曝露が、肥満や肥満に起因する諸病態(糖尿病、高脂血症、脂肪肝など)の発現・進展に關与し得る可能性が指摘されている。

我々は、これまでに、都市の大気汚染物質の主要成分であるディーゼル排気微粒子(DEP)の経気道曝露が、*2*型糖尿病マウスの脂肪肝を増悪し、この増悪には、DEP 構成成分に起因する酸化ストレスが寄与することを明らかにしている¹⁾。さらに、高脂肪食摂取による肥満症マウスモデルを用い、臭素系難燃剤(brominated flame retardants, BFRs)の1つであるhexabromocyclododecane(HBCD)の小児期~成人期曝露が肥満症マウスの体重増加、脂肪肝、高血糖を亢進し、その作用機構として脂肪組織における glucose transporter 4 (Glut4)の発現低下や肝臓における peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppar α)の発現増加が關与している可能性を明らかにした²⁾。

本研究課題で対象物質とする BFRs は、家電製品や繊維製品の難燃剤として、近年その使用が増加している。一方、脂溶性が高く、生物蓄積性を有することから、環境汚染や健康影響が懸念されている。特に、PCB や TCDD と異なり、製品からの放散による室内環境などの一般生活環境での曝露の機会が多い。加えて、BFRs が母乳や人工ミルクに含まれているという報告もあり、小児を中心にその影響が危惧される。

以上のことから、胎児期~小児期における BFRs 曝露が、小児、あるいは成人の肥満症に及ぼす影響について評価し、その作用機構を解明することは、国内のみならず、BFRs による汚染が懸念されている世界各国において、これまでにないリスク情報を与え、削減対策を促す一助となり得る。

2. 研究の目的

本研究では、BFRs の胎児期から小児期における曝露が、小児、あるいは成人の肥満、および肥満に起因する諸病態の発現・進展に及ぼす影響を評価し、その作用機構を解明することを目的とした。加えて、肥満症の急増に対する BFRs の寄与を明らかにすることにより、新たなリスク管理の必要性を提示する。

3. 研究の方法

(1) Decabromodiphenyl ether (decaBDE) の小児期~成人期曝露による肥満症への影響評価

C57BL/6J 雄性マウスを用い、5-20 週齢の間、普通脂肪食(ND, AIN-93M, 正常マウス)、あるいは高脂肪食(HFD, 62.2 kcal% fat, 肥満症マウス)を給餌した(いずれもオリエンタル酵母工業株式会社)。同時に、decaBDE、

および溶媒(0.01% DMSO)を飲水にて曝露した。曝露用量は、一日耐用摂取量(tolerable daily intake=TDI, 7 μ g/kg/day, EU Risk Assessment Report(2000)より)から 10 μ g/kg/day 相当を高用量曝露群とし、その 1/20 量(0.5 μ g/kg/day)と対照群の計 6 群とした(飼料、飲水は自由摂取)。経時的変化(体重変化、摂餌量、摂水量)、グルコース負荷試験(17 週齢)、インスリン負荷試験(18 週齢)、解剖時(20 週齢)における組織重量を測定した。また、血液学的検査は、aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total cholesterol, triglyceride, glucose を測定した。血中ホルモン濃度(insulin, leptin, adiponectin, T3)は ELISA 法にて測定した。組織学的評価は、白色脂肪、褐色脂肪、肝臓、膵臓について Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行い、炎症性変化や脂肪変性を観察した。白色脂肪、褐色脂肪、肝臓、骨格筋における遺伝子発現変化については StepOne PlusTM Real-time PCR System(Applied Biosystems 社製)を用い、 C_T 法により解析した。加えて、脂肪組織に浸潤する免疫担当細胞の構成変化について、脂肪組織由来間質細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーにて解析した。

(2)HBCD の胎児期~乳児期曝露による仔獣の肥満症への影響評価

C57BL/6J 妊娠マウス(GD 5)を導入し、HBCD 100 μ g/kg/day あるいは溶媒(0.001% DMSO)を GD6~PND19(離乳時)の間、自由摂取により飲水曝露した。離乳した仔獣は雌雄を分離し、5-20 週齢の間普通脂肪食、あるいは高脂肪食を摂取させた((1)と同様)評価項目は(1)と同様の内容を実施した。

(3)脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いた BFRs 曝露の影響評価

細胞は、マウス線維芽細胞株(3T3-L1)から 8 または 10、16 日間の培養により分化誘導した脂肪細胞とマウスマクロファージ様細胞株(RAW264.7)を使用した。3T3-L1 は、分化培地(DMEM/10% FBS/10 μ g/mL Insulin/1 μ M Dexamethasone/0.5 mM IBMX)で 5 日間、成熟培地(DMEM/10% FBS/10 μ g/mL Insulin)で 3-11 日間培養した。分化誘導した脂肪細胞は、FBS 除去後、0.25% FBS 含有 DMEM 培地中で、単独およびマクロファージと共培養し、decaBDE または HBCD (1, 5, 10 μ M)に 24 時間曝露した。培養終了後、炎症性サイトカインの tumor necrosis factor- α (TNF- α)、monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1) や抗炎症性因子の adiponectin の産生等を ELISA 法により、脂肪細胞内の脂肪蓄積を Oil red O 染色により測定した。

4. 研究成果

(1)肥満マウス、正常マウスいずれにおいて

も、小児期から成人期における decaBDE 曝露による体重、組織重量(肝臓、内臓白色脂肪、脾臓、脳)、摂餌量、摂水量に対する影響は認めなかった。一方、肥満症マウスに対する decaBDE 高用量曝露で空腹時血糖が対照群に比し有意に上昇し(図 1)、血中インスリン濃度も増加傾向を示した。加えて、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験の結果から、インスリン抵抗性の亢進傾向を認めた。一方、正常マウスにおいても、decaBDE の曝露用量に依存し血糖値の上昇傾向を認めたが、有意な変化ではなかった。

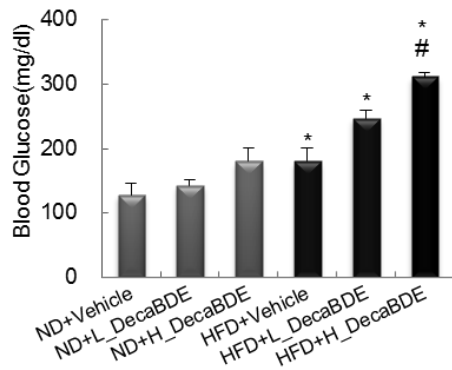


図1. DecaBDE曝露による空腹時血糖の変化
Data were expressed as means \pm SE for 7-8 animals per group. * $p < 0.01$ vs. ND+Vehicle group, # $p < 0.05$ vs. HFD+Vehicle group.

これより、肥満における decaBDE 曝露により糖の取り込み阻害が亢進している可能性が考えられたことから、関連組織における糖代謝関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、骨格筋における Glut4 の発現が対照群に比し有意に減少していた(図 2)。一方、インスリンシグナル伝達経路である insulin receptor (Insr), insulin receptor substrate 1 (Irs1), phosphatidylinositol 3 kinase (Pi3k), protein kinase B (Akt), 3-phosphoinositide dependent kinase-1 (Pdk1), protein kinase C lambda (Pkc) の発現については、ND、HFD 群いずれにおいても decaBDE 曝露による明らかな変化は認めなかった。褐色脂肪組織における Glut1 の発

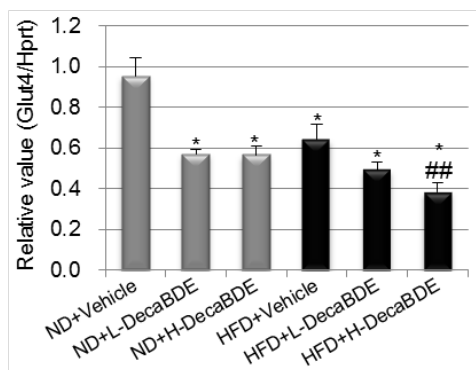


図2. 骨格筋におけるGlut4の遺伝子発現変化
Data were expressed as means \pm SE for 7-8 animals per group. * $p < 0.01$ vs. ND+Vehicle group, ## $p < 0.01$ vs. HFD+Vehicle group.

現に変化はなかったが、mammalian target of rapamycin 2 (mTORC2)が対照群に比し有意に減少した。一方、肝臓、および白色脂肪組織については、decaBDE 曝露による変化は認められなかった。過去の報告で、decaBDE の胎児期曝露により雄仔の血中 T3 濃度が低下すること¹⁾、新生児曝露によりセルトリ細胞の thyroid hormone receptor (Thra) の発現が減少すること²⁾が報告されている。また、骨格筋における Thra の発現は、グルコースの恒常性やエネルギー消費に関与するという報告もあることから³⁾、骨格筋における Thra の遺伝子発現を解析した結果、decaBDE 高用量曝露群において対照群に比し、有意な低下を認めた。また、血清中 T3 濃度も低下傾向を示した。

以上の結果から、食餌性の肥満症における decaBDE 曝露は、糖代謝機能のかく乱を介し、血糖値の上昇に寄与する可能性が考えられた。また、この作用には decaBDE 曝露によるホルモン、およびホルモン受容体の発現変動も一部寄与している可能性が示唆された。

また、脂肪組織における炎症反応への影響を評価するため、脂肪組織培養の実験系の確立を試みた。採取した内臓脂肪組織(腸間膜、腎臓周辺、精巣上体周辺)を Serum-free M199 培地で2または3日間培養し、培養上清中への TNF- α 、CCL2/MCP-1、interleukin (IL)-6、adiponectin の分泌を確認した。本培養系を用い、前述の実験系における肥満症マウスの脂肪組織について2日間培養で検討した結果、decaBDE 曝露により精巣上体周辺脂肪組織における IL-6 産生の増加傾向と腸間膜脂肪組織における adiponectin 産生の低下傾向が観察された。今回、遺伝子発現や病理組織学的な解析では脂肪組織における明らかな変化は認めなかったが、decaBDE 曝露による潜在的な影響がある可能性が考えられた。

(2) 胎児期から小児期における HBCD 曝露により、雌雄いずれの仔獣においても体重、組織重量(肝臓、内臓脂肪組織、脳)、摂餌量、摂水量に対する影響は認めなかったが、肥満症の雌仔において空腹時血糖の上昇が認められた。雌仔における高血糖の作用機序を解明するため、糖代謝・糖新生関連遺伝子の発現を解析した。肝臓の glucose-6-phosphatase (G6pc), phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pepck), Glut2、骨格筋および白色脂肪組織の Insr, Irs1, Akt, Pi3k, Glut4 の発現は、いずれの項目においても HBCD 曝露による顕著な変化が認められなかった。雌仔の卵巣周辺白色脂肪組織由来間質細胞のフェノタイプを解析した結果、マクロファージの表面マーカーである F4/80⁺CD11c⁺細胞の割合が増加傾向を示し、Ccl2, Ccr2, F4/80, Cd11c の遺伝子発現も上昇傾向を示した。さらに、前述の実験系における肥満症の雌仔の腸間膜、または卵巣周囲脂肪組織を3日間培養し、

培養上清中の TNF- α 、CCL2/MCP-1、IL-6 を測定した結果、いずれも HBCD 曝露により増加する傾向が観察された（腸間膜脂肪組織の IL-6 産生を除く）。加えて、骨髄における変化を解析した結果、骨髄液中のケモカインレベルについては、対照群に比し、HBCD 群で CCL2/MCP-1 の増加および stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1) の増加傾向が観察された。骨髄細胞における明確な変化は認められなかった。これより、影響の程度は大きくないものの、HBCD 曝露による骨髄環境の変化が脂肪組織の炎症を誘導し、血糖値上昇に一部寄与している可能性が示唆された。病理組織学的評価では、肝臓、白色脂肪組織における HBCD 曝露の影響は認めなかったが、雌仔の HBCD 群において対照群に比し、脾臓における小葉の脂肪化の亢進が観察された。

以上の結果から、胎児期から乳児期における HBCD 曝露により、成長後の肥満病態における血糖値上昇を促進し、その作用機序として、脂肪組織における炎症反応の亢進が一部寄与している可能性が考えられた。加えて、その影響には性差があることが示唆されたが、今回、雌仔のみに影響が認められた機序についてはさらなる検討が必要である。

(3)脂肪細胞とマクロファージの共培養系における BFRs (decaBDE および HBCD) 曝露の影響を *in vitro* で検討した。その結果、脂肪細胞単独培養に対する影響は軽微であったが、マクロファージとの共培養系では、その細胞数依存的に、また BFRs の濃度依存的に CCL2/MCP-1 の顕著な増加が認められた(図3)。

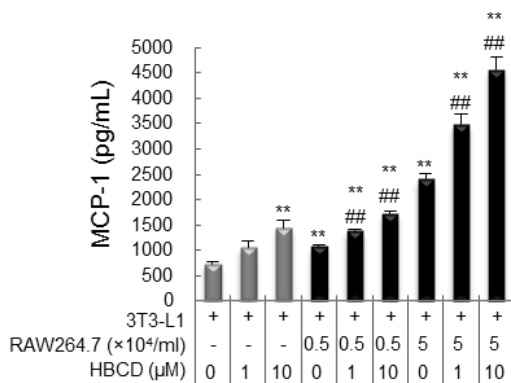


図3. 脂肪細胞とマクロファージの共培養におけるHBCD曝露によるMCP-1産生の変化
Data were expressed as means \pm SE for triplicate culture. * p <0.05, ** p <0.01 vs. 3T3-L1 (+), RAW264.7 (-)-Control; # p <0.05, ## p <0.01 vs. 3T3-L1 (+), RAW264.7 (+)-Control.

マクロファージに由来する TNF- α の産生もまた、共培養系において BFRs の濃度依存的に増加した。adiponectin の産生は、脂肪細胞成熟が進むにつれて低下し、BFRs 曝露によ

り低下傾向を示したものの明確な影響は認められなかったが、マクロファージの存在により有意に抑制された。脂肪細胞の脂肪蓄積に与える BFRs の影響は、分化・成熟段階により異なる結果を示し、マクロファージ存在下では脂肪滴の縮小が観察され、細胞外への脂肪酸の放出やマクロファージへの取り込みが促進されている可能性が考えられた。以上より、decaBDE および HBCD 曝露は脂肪細胞とマクロファージの相互作用を修飾し、炎症反応を亢進する可能性が示唆された。

本研究課題において、BFRs 曝露により TDI 相当の低用量曝露でも肥満症の病態を増悪する可能性があること、軽微ではあるが胎児期～乳児期曝露による肥満症の病態を亢進する可能性が示唆された。この結果は、肥満症を始めとした有病者や胎児・小児などの、化学物質に対して高感受性、脆弱性を示す集団に対する影響も視野に入れたリスク管理の必要性を提示するものである。加えて、感受性要因の一つとして、性差も考慮する必要性を示した。今後はさらに、実環境中の曝露濃度による影響の有無についても検討する必要がある。本研究で、BFRs 曝露による臓器間、細胞間の相互作用による病態増悪の一端を示すことができたことは、BFRs に関する新たな知見を得ることができたものとする。今後は BFRs の動態や生体内における化学形態との関連性も含めさらなるデータの蓄積が必要である。

<引用文献>

- 1) Tomaru M, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Osakabe N, Yasuda A, Shimada A, Kato Y, Uematsu H. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances fatty change of the liver in obese diabetic mice. *Int J Mol Med.* 2007 Jan;19(1):17-22
- 2) Yanagisawa R, Koike E, Win-Shwe TT, Yamamoto M, Takano H. Impaired lipid and glucose homeostasis in hexabromocyclododecane-exposed mice fed a high-fat diet. *Environ Health Perspect.* 2014 Mar;122(3):277-83.
- 3) Tseng, L.H., Li, M.H., Tsai, S.S., Lee, C.W., Pan, M.H., Yao, W.J., Hsu, P.C., Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209): effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring. *Chemosphere* 2008 70, 640-647.
- 4) Miyaso, H., Nakamura, N., Naito, M., Hirai, S., Matsuno, Y., Itoh, M., Mori, C. Early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether affects expression of androgen and thyroid hormone receptor-alpha and its splicing variants in mouse Sertoli cells. *PLoS One* 2014 9, e114487.
- 5) Simonides, W.S., van Hardeveld, C.

Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid* 2008 18, 205-216.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

柳澤利枝, 小池英子, Tin-Tin-Win-Shwe
臭素系難燃剤デカブロモジフェニルエーテルの経口曝露が肥満症に及ぼす影響. 第88回日本衛生学会学術総会 2018年3月24日, 東京

柳澤利枝, 小池英子, Tin-Tin-Win-Shwe
有機臭素系難燃剤デカブロモジフェニルエーテルが食餌性肥満に及ぼす影響. 第37回日本肥満学会. 2016年10月8日, 東京

小池英子, 柳澤利枝, Tin-Tin-Win-Shwe
ヘキサブロモシクロドデカンが脂肪細胞とマクロファージによる炎症反応に及ぼす影響. 第23回日本免疫毒性学会学術年会. 2016年9月6日, 北九州市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 利枝 (Rie Yanagisawa)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：70391167

(2) 研究分担者

小池 英子 (Eiko Koike)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・室長
研究者番号：60353538

Tin-Tin Win-Shwe(平成 25-26 年度)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：00391128

(3) 連携研究者

Tin-Tin Win-Shwe(平成 27-29 年度)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：00391128