

学位論文要旨

炭素鎖長の異なるペルフルオロカルボン酸の生体影響に関する系統的な研究 —脂肪酸代謝および脳機能への影響について—

学位申請者 氏名 川畑 公平

ペルフルオロアルキル酸の 1 種であるペルフルオロアルキルカルボン酸 (PFCA) は、アルキル基の水素原子を全てフッ素原子に置換した脂肪酸アナログである。絶縁性、潤滑性および撥水・撥油性などのユニークな性質を有しているため、コーティング剤、防汚剤、絶縁体および撥水・撥油剤など様々な用途で使用されてきた。しかし PFCA は、化学的にも生物学的にも安定であり、環境中に排出されても分解されず、PFCA による環境汚染が深刻な問題となっている。環境中や動物、ヒト体内からは種々の炭素鎖長の PFCA が検出されているが、使用量が最も多いペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は他に比べて濃度が高い。PFOA に関する生体影響は詳しく研究され、報告も多いのに対し、炭素鎖長の長い PFCA に関する研究は少ない。炭素鎖長が異なれば PFCA の生体影響は大きく異なる可能性が考えられるため、本研究ではモノ不飽和脂肪酸代謝と脳機能に焦点をあて、炭素鎖長の異なる PFCA の影響を系統的に明らかにすることを試みた。

第 1 章 PFOA の肝臓モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) 代謝に対する影響 —クロフィブリン酸との比較—

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α) は生体におけるエネルギー代謝調節、特に脂肪分解調節に関与する核内受容体であり、PFCA およびフィブレート系薬物等が外因性リガンドとして知られている。フィブレート系薬物の 1 種であるクロフィブリン酸は、MUFA 合成関連酵素の遺伝子発現量を増加させ、18:1n-9 量を増加させることが報告されているため、本章では PFOA の MUFA 代謝に対する影響をクロフィブリン酸と比較した。PFOA またはクロフィブリン酸を添加した飼料を雄性 Wistar 系ラットに摂取させ、MUFA 合成の鍵となる遺伝子 *Scd1* 発現量および PPAR α の標的遺伝子 *Acot1* の発現量への影響を詳細に比較した。両化合物ともに *Scd1* 発現量と *Acot1* 発現量の間に正の相関が認められた。一方、代表的な MUFA であるオレイン酸 (18:1n-9) と stearoyl-CoA desaturase (SCD) 活性の相関を調べたところ、PFOA はクロフィブリン酸と比べて、SCD 活性の増加に対する 18:1n-9 量の増加の割合が顕著に高いという相違点が明らかになった。さらに 18:1n-9 の代謝に関与する酵素・タンパク質の遺伝子発現量を網羅的に解析したところ、PFOA はクロフィブリン酸に比べてトリアシルグリセロール (TAG) 合成関連遺伝子の発現を強く誘導することが明らかとなった。以上の結果から、PFOA がクロフィブリン酸に比べて肝 18:1n-9 量の増加作用が強い原因として、TAG 合成を促進して TAG に 18:1n-9 を貯蔵するためであることが示唆された。

第 2 章 炭素鎖長の異なる PFCA の肝臓 TAG 代謝に対する影響

PFOA、ペルフルオロデカン酸 (PFDA) およびペルフルオロドデカン酸 (PFDoA) の 3 種類の PFCA に関して、肝 TAG に対する影響を比較した。PFOA に比べて PFDA は肝 TAG を著しく増加させた。PFDA は PFOA に比べて肝臓への蓄積性が高いことが肝 TAG 増加作用の原因と考えられた。PFDoA もまた肝 TAG を増加させたが、PFDA ほど強い効果は認められなかった。しかし、PFDoA の肝濃度は PFDA とほぼ同程度であった。3 種の PFCA について肝臓中濃度と肝 TAG 量の相関をとったところ、高用量の

PFDAのみ相関曲線から大きく外れて、TAGの高蓄積が認められた。そこで、肝TAGの合成・分解に関わる酵素・タンパク質の遺伝子発現量を比較したところ、*Dgat1* 遺伝子の発現量が高用量のPFDAにより著しく増加していた。*Dgat1* 遺伝子の発現量と肝TAG量の間には高い相関が認められた。この結果から、肝TAGに対するPFDAの作用がPFOAやPFDoAと異なるのは、PFDAの高い肝残留性に加えてTAG合成系に対する影響がPFOAおよびPFDoAとは質的に異なるためであることが明らかになった。

第3章 炭素鎖長の異なるPFCAの生体内分布および脳機能に対する影響

PFDoAの体内分布および消失を調べた。雄性Wistar系ラットにPFDoAを経口より単回投与し、組織分布を調べたところ、PFDoAは肝臓および腎臓に多く分布した。PFOAおよびPFDAの組織分布と比較すると、PFDoAにのみ特徴的な脂肪組織と脳への移行が認められた。主要組織におけるPFDoA濃度の半減期は概ね同程度であった。脳へと移行したPFCAが脳機能に影響を及ぼすことが予想されたため、行動薬理試験によりPFDoAの脳機能への影響を評価したところ、新奇物体探索試験にて学習能力の低下が認められた。学習能力の低下はPFDoAの用量および脳内濃度と相関した。PFOAおよびPFDAは脳へわずかししか移行せず、また、学習能力に対して影響を与えなかった。PFDoAは、PFOAおよびPFDAとは大きく異なり、脳への高い移行性のために学習能力の低下を引き起こすことが示唆された。

第4章 肝臓中のMUFA組成に偏りが生じるメカニズム

肝臓においてMUFAは16:0から合成される。16:0が鎖伸長された後にSCDによって9位が不飽和化され18:1 $n-9$ が合成される。またSCDは、16:0を9位の不飽和化によって16:1 $n-7$ に変換し、さらに炭素鎖伸長を受けて18:1 $n-7$ が合成される。16:0と18:0に対するSCDの基質特異性はほぼ同程度であり、肝臓における18:1 $n-9$ の含量は16:1 $n-7$ と18:1 $n-7$ の合計と同程度であると予想される。しかし、ラット肝総脂質中の脂肪酸組成を調べると、18:1 $n-9$ の割合は16:1 $n-7$ と18:1 $n-7$ の合計の2倍程度と大きく異なる。本章ではMUFA組成が $n-9$ 系に偏っていることに着目し、そのメカニズムの検証を行った。PFOAはSCDの遺伝子発現量および活性を亢進させ、18:1 $n-9$ 量を増加させるのに対し、16:1 $n-7$ と18:1 $n-7$ の量は増加させなかった。一方、MUFAの分解に着目すると、16:1 $n-7$ は18:1 $n-7$ および18:1 $n-9$ と比べて分解されやすいことが明らかとなった。PPAR α アゴニストであるクロフィブリン酸をPFOAのかわりに用いて更なるメカニズム解析を行った。加えて、無脂肪食を用いて食餌からの脂肪酸の供給をなくし、クロフィブリン酸との比較を行った。クロフィブリン酸はMUFAの合成系と分解系をともに亢進したが、無脂肪食はMUFA合成系のみを亢進させた。MUFA組成を比較するとクロフィブリン酸は18:1 $n-9$ のみを増加させたが、無脂肪食は3種のMUFAすべての量を増加させた。3種のMUFAの分解速度を*in vitro*および*ex vivo*で比較した結果、16:1 $n-7$ は18:1 $n-7$ および18:1 $n-9$ と比べて分解されやすいことが明らかとなった。MUFAの組成は、その合成ばかりでなく分解によって調節を受け、結果として16:1 $n-7$ の量が低く保たれることが示唆された。

以上、本論文では炭素鎖長の異なるPFCAの生体作用をMUFAの蓄積、TAGの蓄積、脳機能の影響という観点から比較し、PFCAの生体作用は、その生体内分布や残留性によって規定されるばかりでなく、炭素鎖長の異なるPFCAの質的な違いにより異なることを明らかにした。

Abstract of Ph. D. thesis

Studies on the effects of perfluorocarboxylic acids with different carbon chain lengths on biological systems

-The effects on lipid metabolism and brain function-

Degree applicant: Kohei Kawabata

Perfluorocarboxylic acids (PFCAs), species of perfluoroalkyl acids, are fatty acid analogues where every hydrogen atom bonded with carbon atom on the alkyl group is replaced by a fluorine atom. Because of their unique properties including insulation properties, lubricity, water-repellency and oil-repellency, they have been used for multiple uses such as coating agent, antifouling agent, insulator, water-repellents and oil-repellents. However, environmental pollution with PFCAs have been a serious problem because of their stability and persistence in the environment. PFCAs have become a focus of public health concern due to their widespread presence in wildlife and humans. Among PFCAs, perfluorooctanoic acid (PFOA), which has eight carbon atoms, have been extensively studied for their biological effects since PFOA have been shown to be the predominant PFCA in humans and wildlife and are the most abundant in the environment while biological effects of PFCAs with more than 9 carbon atoms remains to be solved. Therefore, information on the biological effects of these PFCAs is indispensable to assess the risk of these chemicals on the wildlife and humans. Thus, the aim of this study is to estimate systematically the effects of PFCAs with different carbon chain lengths on the monounsaturated fatty acid (MUFA) metabolism in the liver and the brain function.

Chapter 1: The effects of PFOA on the MUFA metabolism: Comparison with clofibric acid.

It is reported that both PFOA and clofibric acid induce the gene expression related to MUFA synthesis and increases hepatic 18:1 $n-9$ content in the liver of rats through the activation of peroxisomal proliferator-activated receptor α (PPAR α), a member of ligand-activated transcription factors. In this chapter, the effects of PFOA on MUFA metabolism were compared to that of clofibric acid. Both PFOA and clofibric acid induced the hepatic gene expression of *Scd1*, a key enzyme of MUFA synthesis, and *Acot1*, a major target gene of PPAR α , in dose-dependent manners in the rats. A positive correlation was observed between *Scd1* and *Acot1* irrespective of chemical species in the liver. By contrast, a positive linear correlation between stearoyl-CoA desaturase (SCD) activity and hepatic 18:1 $n-9$ content obtained from PFOA-treated rat was not correspondence with that from clofibric acid-treated rat. Analysis of the gene expression of enzymes and proteins that responsible for 18:1 $n-9$ metabolism revealed that PFOA more strongly induced the gene expression related to triacylglycerol (TAG) synthesis compared to clofibric acid. These results suggested that PFOA more strongly activated TAG synthesis compared to clofibric acid, resulting in an increase in 18:1 $n-9$ stored as TAG in the liver of rats.

Chapter 2: Comparison between PFCAs with different carbon chain lengths of the effects on TAG metabolism.

Next, hepatic TAG contents were compared between PFOA-, perfluorodecanoic acid (PFDA)- and perfluorododecanoic acid (PFDoA)-treated rats. When hepatic TAG contents were normalized by PFCA concentrations, a mild TAG increase was observed with PFOA and PFDoA while a significant TAG increase was observed with PFDA. Then, the effects on the expression of genes involved in TAG metabolism in the liver were compared between these PFCAs. Among them, the expression of *Dgat1* that catalyzes acylation of diacylglycerol

to obtain TAG was strongly induced by PFDA, weakly induced by PFDoA and not significantly altered by PFOA. A positive linear correlation was obtained between *Dgat1* expression and TAG content. It is suggested that the effect of PFDA on hepatic TAG is different from that of PFOA and PFDoA on the view of TAG synthesis, and these difference are due to quality addition to quantity of PFCA.

Chapter 3: Comparison between PFOA, PFDA and PFDoA of tissue distribution, disposition and the effects on the brain function.

In this chapter, the distribution and disposition of PFDoA in various tissues after an oral dose were determined and compared with those of PFOA and PFDA. When rats were orally administered with PFDoA at the dose of 50 mg/kg, PFDoA was mainly found in the liver followed by kidney: the distribution pattern was quite different from those of PFOA and PFDA. PFDoA was found to distribute in the brain and adipose tissue, while PFOA and PFDA hardly distributed in these tissues. Biological half-life ($T_{1/2}$) of PFDoA for serum was calculated to be 56 days. The values of $T_{1/2}$ for other tissues were comparable to that of serum. Neurobehavioral effects of PFDoA were evaluated by behavioral tests. Cognitive deficit was observed in PFDoA-treated rats but not in PFOA- and PFDA-treated rats with the novel object recognition test. The magnitude of cognitive deficit was dependent on the dose of PFDoA and the concentrations of PFDoA in the brain. Thirtyone days after the treatment of PFDoA, PFDoA level in the brain decreased to approximately 30 $\mu\text{g/g}$, and cognitive deficit was still observed. These results suggest that PFDoA distributes in the brain easier than PFOA and PFDA, and causes cognitive deficit.

Chapter 4: Mechanism of regulating MUFA proportion, particularly keeping 16:1 n -7 level low in the liver

MUFAs are synthesized from 16:0 in the liver. 16:0 is initially elongated to 18:0, which is subsequently desaturated by SCD to yield 18:1 n -9, or 16:0 is initially desaturated to produce 16:1 n -7, after which the 16:1 n -7 is elongated to 18:1 n -7. It is recognized that SCD catalyzes the desaturation of 16:0 and 18:0 at largely the same rate in the liver, implying the abundance of 16:1 n -7 plus 18:1 n -7 is similar to that of 18:1 n -9. Nevertheless, the proportions of 16:1 n -7 and 18:1 n -7 were markedly lower than that of 18:1 n -9 in the liver of rats. Both PFOA and clofibric acid enlarged the imbalance of n -9/ n -7 MUFA. In this chapter, not only synthesis but also degradation was focused to obtain a clearer understanding for low proportion of 16:1 n -7. Estimation of MUFA oxidation rate *ex vivo* revealed that both PFOA and clofibric acid similarly up-regulated three MUFAs. Therefore, clofibric acid was employed instead of PFOA for further analysis for the mechanisms. Fat-free diet, which upregulates MUFA synthesis but not fatty acid oxidation, was also employed to understand the role of fatty acid oxidation. Fat-free diet increased the proportion of three MUFAs while clofibric acid increased only 18:1 n -9 proportion in the liver. Both clofibric acid and fat-free diet caused upregulation of the gene expression, protein expression and enzymatic activity of the enzymes responsible for MUFA synthesis. By contrast, clofibric acid caused up-regulation of the gene and protein of the enzymes responsible for fatty acid degradation but fat-free diet did not. The rate of 16:1 n -7 oxidation was greater than those of 18:1 n -7 and 18:1 n -9 in the liver of control rats both *ex vivo* and *in vitro*. Clofibric acid increased the oxidation rates of three MUFAs equally while fat-free diet did not. These results suggested that fatty acid oxidation plays a key role in regulating the MUFA profile and is crucially involved in maintaining low 16:1 n -7 levels in the liver.

Conclusion: The present study showed that the biological effects of PFCAs with different carbon chain lengths are different in the view of MUFA metabolism, TAG accumulation and the effects on brain function.

論文審査の結果の要旨

ペルフルオロカルボン酸 (PFCA) とはアルキル基の水素原子を全てフッ素原子に置換したペルフルオロアルキル酸の一種である。PFCA は化学的にも生物学的にも安定であることに加え、絶縁性、潤滑性および撥水・撥油性などのユニークな性質を有するため、コーティング剤、防汚剤、絶縁体および撥水・撥油剤など様々な用途で使用されてきた。しかし、環境中に排出された PFCA は分解されないため、PFCA による環境汚染が深刻な問題となっている。中でも、炭素数 8 のペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の使用量が最も多く、環境中からの検出例も多い。野生生物およびヒトからも検出されており、ヒトの健康への影響が強く懸念されるようになった。生体影響に関する報告も多く存在し、ヒトにおいても健康を害することが示唆された報告がある。これらの報告は、使用量および環境中からの検出量が多い PFOA に焦点を当てたものが多い。しかし、PFOA のみならず、これより炭素鎖長の長い PFCA である炭素数 10 のペルフルオロデカン酸 (PFDA) や炭素数 12 のペルフルオロドデカン酸 (PFDoA) 等も環境中から検出されているとの報告がある。しかし、これらの生体影響に関する報告はほとんどない。川畑氏は、PFCA の生体影響に関して、炭素鎖長の異なる PFCA を系統的に比較した研究が必要であると考え、本研究において炭素鎖長の異なる PFCA のモノ不飽和脂肪酸 (MUFA) 代謝への影響および脳機能への影響を系統的に明らかにすることを目的として検討を行った。

第 1 章 PFOA の肝臓モノ不飽和脂肪酸 (MUFA) 代謝に対する影響 ―クロフィブリン酸との比較―

これまでに、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α) は生体におけるエネルギー代謝調節、特に脂肪分解調節に関与し、外因性リガンドとしては PFCA およびフィブレート系薬物等があることが報告されている。フィブレート系薬物の 1 種であるクロフィブリン酸は脂肪酸分解関連酵素に加え、MUFA 合成関連酵素の遺伝子発現量を増加させ、18:1*n*-9 量を増加させる。一方、PFOA の MUFA 代謝に対する影響に関して詳細な報告がないため、川畑氏は本章でこの検討を行った。その結果、PFOA はクロフィブリン酸を餌に混ぜて雄性 Wistar 系ラットに摂取させたところ、肝臓において両者は PPAR α 標的遺伝子 *Acot1* 発現量、MUFA 合成の律速酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD) の遺伝子発現量および活性を増加させたが、その誘導作用は PFOA の方が小さいことが判明した。さらに、肝 18:1*n*-9 量に関する影響を比較すると、SCD 活性の上昇に伴う 18:1*n*-9 量の増加作用は PFOA の方が大きかった。MUFA 合成系以外の部分において両者で差異があると考え、肝臓における 18:1*n*-9 代謝関連遺伝子の発現量を網羅的に解析したところ、PFOA の方がトリアシルグリセロール (TAG) 合成関連遺伝子の発現量を上昇させることが明らかとなった。以上より川畑氏は、PFOA はクロフィブリン酸と比べて TAG 合成を亢進させるため、18:1*n*-9 を肝臓に貯蔵する作用が大きいうという新知見を得た。

第 2 章 炭素鎖長の異なる PFCA の肝臓トリアシルグリセロール代謝に対する影響

川畑氏は本章においては、異なる炭素鎖長の PFCA の肝 TAG 蓄積作用を系統的に比較検討を行っている。PFOA、PFDA および PFDoA を餌に混ぜて雄性 Wistar 系ラットに摂取させたところ、高用量の PFDA および PFDoA は肝 TAG 量を増加させ、さらに肝臓中に高濃度に蓄積することが明らかとなった。また、PFDA と PFDoA は肝臓中に同程度蓄積するが、肝 TAG 蓄積作用は PFDA の方が大きいことが認められた。一方、PFOA は肝 TAG 量を増加させず、肝臓への蓄積性も小さかった。TAG 代謝関連遺伝子

の発現を調べたところ、TAG 合成に関与する *Dgat1* の発現量が PFDA 群でのみ顕著に上昇した。PFDA は TAG 合成系を亢進し、肝 TAG 増加作用が大きいいため、他の PFCA とは異なり肝 TAG 量を顕著に増加させるとの知見を得た。

第3章 炭素鎖長の異なる PFCA の生体内分布および脳機能に対する影響

第2章の結果より、炭素鎖長の異なる PFCA は肝 TAG 量に対して異なる影響を及ぼすことを明らかにした。PFCA の炭素鎖長が長くなるにつれて生体残留性が高くなるとされているが、PFDoA の動態に関する報告はないので、本章にて検討を行った。雄性 Wistar 系ラットに PFDoA を経口単回投与し組織分布を調べたところ、PFDoA は肝臓および腎臓に多く分布した。また、主要組織における PFDoA 濃度の半減期は概ね同程度であった。PFOA および PFDA の組織分布と比較すると、PFDoA は全ての組織への移行性が高く、さらに PFDoA のみ脂肪組織と脳への移行を認めた。脳へと移行した PFCA が脳機能に影響を及ぼすことが予想されたため、川畑氏は行動薬理試験により PFDoA の脳機能への影響を評価している。PFDoA 投与 5-6 日後において、新奇物体探索試験にて学習能力の低下が認められた。他の PFCA と比較して PFDoA のみ顕著な脳内移行性と学習能力の低下が認められた。さらに PFDoA の投与量もしくは投与してからの時間を変えて検討した結果、PFDoA の脳内濃度に応じて学習能力の低下が引き起こされることを明らかとした。

第4章 肝臓中の MUFA 組成に偏りが生じるメカニズム

肝臓において MUFA は 16:0 から合成される。16:0 が鎖伸長された後に SCD によって 9 位が不飽和化されて 18:1 $n-9$ が合成される。また SCD は、16:0 の 9 位を不飽和化して 16:1 $n-7$ とし、それが鎖伸長によって 18:1 $n-7$ が合成される。16:0 と 18:0 に対する SCD の基質特異性はほぼ同程度であり、肝臓における 18:1 $n-9$ の含量は 16:1 $n-7$ と 18:1 $n-7$ の合計と同程度であると予想される。しかし、ラット肝臓脂質中の脂肪酸組成を調べると、18:1 $n-9$ の割合は 16:1 $n-7$ と 18:1 $n-7$ の合計の 2 倍程度である。本章において川畑氏は、MUFA 組成が $n-9$ 系に偏っていることに着目し、そのメカニズムの検証を行っている。PFOA は SCD の遺伝子発現量および活性を亢進するものの、18:1 $n-9$ 量は増加させるのに対し 16:1 $n-7$ と 18:1 $n-7$ の量は増加させなかった。一方、MUFA の分解に着目すると、16:1 $n-7$ は 18:1 $n-7$ および 18:1 $n-9$ と比べて分解されやすいことを明らかにした。PFOA は毒物であるため、メカニズム解析のためのツールとして同じく PPAR α アゴニストであるクロフィブリン酸を用いて同様の検討を行ったところ、クロフィブリン酸は MUFA の合成系と分解系をともに亢進し、さらに 16:1 $n-7$ が分解されやすいため、MUFA 組成に偏りが生じることを明らかにした。本章において川畑氏は、MUFA の組成がその合成ばかりでなく分解によっても調節を受け、結果として 16:1 $n-7$ の量が低く保たれることを明らかとした。

以上、川畑氏は本研究において炭素鎖長の異なる PFOA、PFDA および PFDoA の生体作用と体内分布を比較し、これら 3 種類の PFCA には特徴的な違いが存在することを明らかにし、さらに、PFCA の生体作用は残留性だけでなく、個々の PFCA の作用の強さに起因することを明らかにした。これらは当研究分野において多くの新知見を加えたことにより多大な貢献をしたと考えられ、本研究科において課程によらない博士（薬科学）の学位を授与するに値するものと判断する。