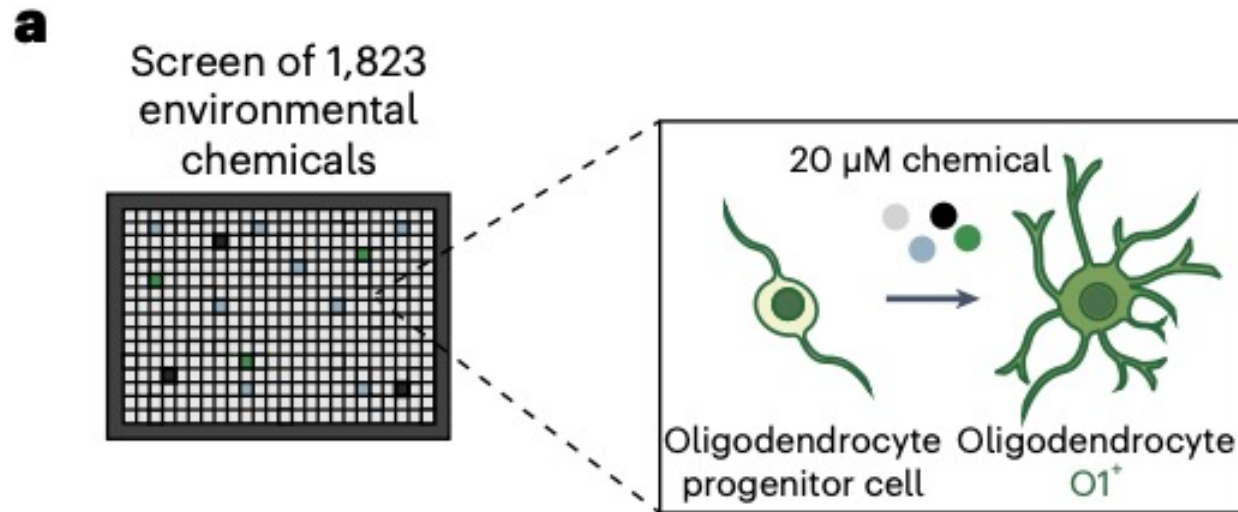


**Pervasive environmental chemicals impair
oligodendrocyte development
(nature neuroscience 2024.3.25)**

概要

- オリゴデンドロサイトに対する潜在的リスクについて評価された環境化学物質はほとんどないとされてきた
- 消毒剤などに含まれる2種類の化学物質がオリゴデンドロサイトの発達を阻害することがわかった
- マウスおよびヒトの出生前的大脑皮質発達の3Dオルガノイドモデルにおいて、生後のオリゴデンドロサイトの発達を障害した

Figure1



- マウス多能性幹細胞（mPSC）由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）を使用
- OPCからオリゴデンドロサイトへの発生に対する影響を評価するため、1823種類の化学物質からなるライブラリーをスクリーニングした

Figure1

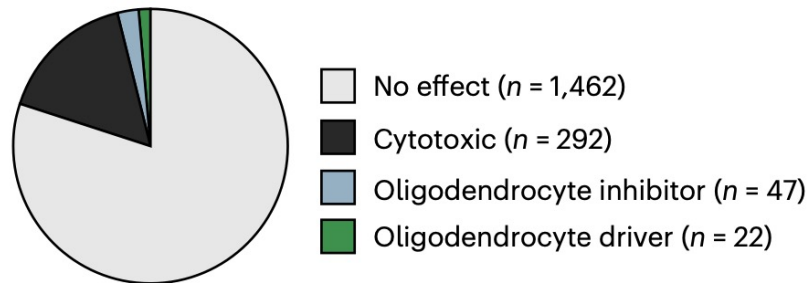
- 『発生中のオリゴデンドロサイトに細胞毒性を示す化学物質』
- 『細胞毒性を示さずにオリゴデンドロサイトの生成を阻害する化学物質』

の両方を同定できた。

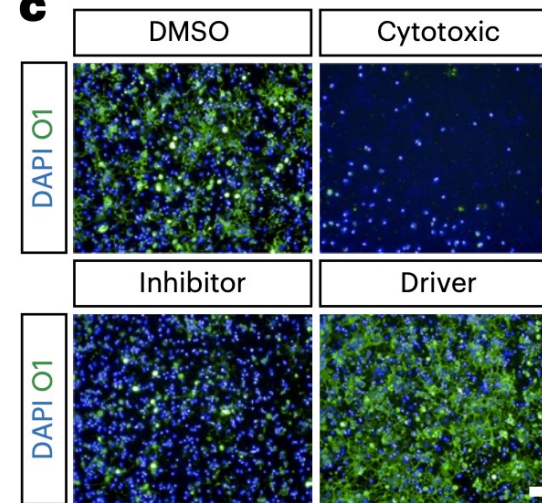
Figure1

b

Distribution of hits



c



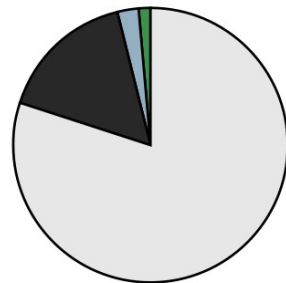
- 『細胞毒性』はDAPI染色で生存核を定量することにより決定。生存率を30%以上減少させた化学物質を細胞毒性があるとみなした。

Figure1

成熟オリゴデンドロサイトにのみ発現する抗原

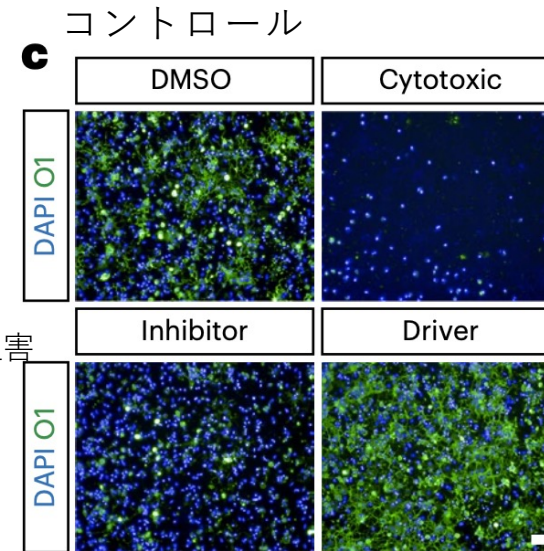
b

Distribution of hits



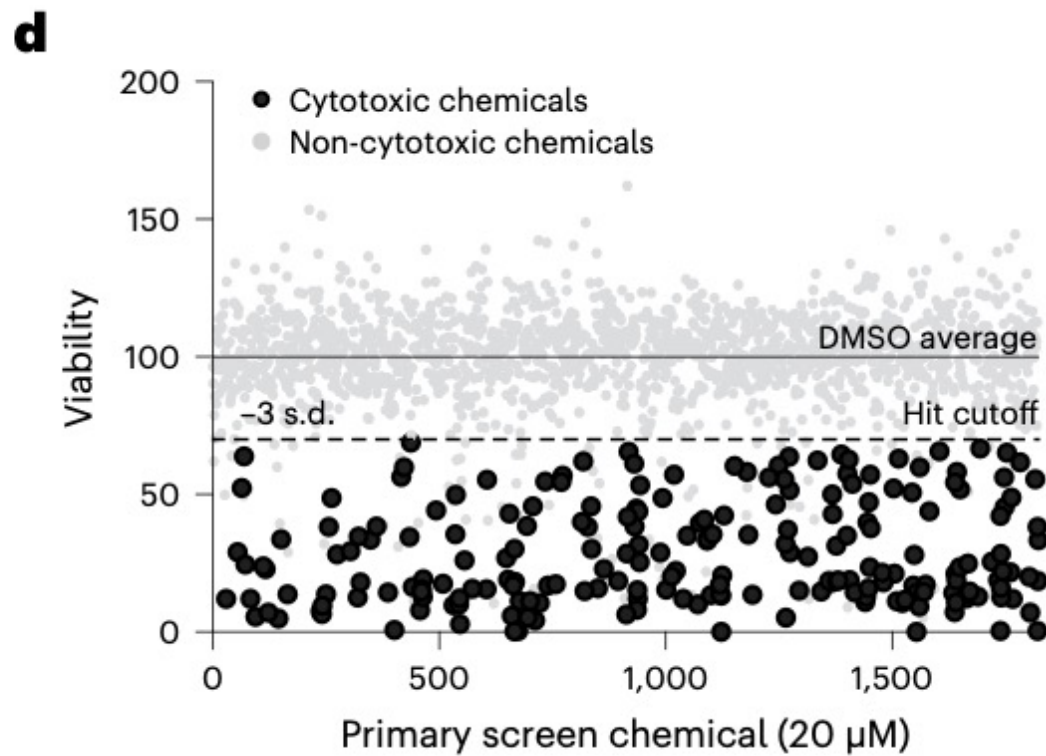
- No effect (n = 1,462)
- Cytotoxic (n = 292) 細胞毒性
- Oligodendrocyte inhibitor (n = 47) 発生阻害
- Oligodendrocyte driver (n = 22) 発生促進

c



- 『非細胞毒性でオリゴデンドロサイト発生を阻害』はO1抗原の免疫染色により成熟オリゴデンドロサイトを定量し決定。O1+細胞の割合を50%以上減少させたらオリゴデンドロサイト発生阻害剤とみなした。

Figure1



・代謝活性を測定することで細胞生存率を評価する比色測定法（MTSアッセイ）

Figure1

e



半数阻害濃度

Cytotoxic chemical	Oligodendrocyte cytotoxicity IC ₅₀ (μM)	EPA cytotoxicity median (μM)	Potency score	Use category
Tributyltetradecylphosphonium chloride	0.025	17.1	680	Biocide
Methyltrioctylammonium chloride	0.036	19.6	538	Biocide
Basic Blue 7	0.066	18.9	288	Dye
3,3'-Dimethylbenzidine	3.55	1,000	282	Dye
Diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate	6.42	1,000	156	Plasticizer
3,3'-Dimethoxybenzidine	0.180	20.7	115	Dye
Didecyldimethylammonium chloride	0.209	23.8	114	Biocide
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.531	30.9	58	Biocide
Methylbenzethonium chloride	0.438	24.2	55	Biocide
2,4-Dimethylphenol	29.3	1,000	34	Fragrance

Figure1

e



Cytotoxic chemical	Oligodendrocyte cytotoxicity IC ₅₀ (μM)	EPA cytotoxicity median (μM)	Potency score	Use category
Tributyltetradecylphosphonium chloride	0.025	17.1	680	Biocide
Methyltrioctylammonium chloride	0.036	19.6	538	Biocide
Basic Blue 7	0.066	18.9	288	Dye
3,3'-Dimethylbenzidine	3.55	1,000	282	Dye
Diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate	6.42	1,000	156	Plasticizer
3,3'-Dimethoxybenzidine	0.180	20.7	115	Dye
Didecyldimethylammonium chloride	0.209	23.8	114	Biocide
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.531	30.9	58	Biocide
Methylbenzethonium chloride	0.438	24.2	55	Biocide
2,4-Dimethylphenol	29.3	1,000	34	Fragrance

- オリゴデンドロサイトの発生には細胞毒性を示すが、アストロサイトには細胞毒性を示さない化学物質を、10点用量反応アッセイ（40 nM～20 μM）で試験し、その結果を用いて各化学物質の、発生を50%阻害する濃度（IC₅₀）値を算出した

Figure1

e



Cytotoxic chemical	Oligodendrocyte cytotoxicity IC ₅₀ (μM)	EPA cytotoxicity median (μM)	Potency score	Use category
Tributyltetradecylphosphonium chloride	0.025	17.1	680	Biocide
Methyltrioctylammonium chloride	0.036	19.6	538	Biocide
Basic Blue 7	0.066	18.9	288	Dye
3,3'-Dimethylbenzidine	3.55	1,000	282	Dye
Diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate	6.42	1,000	156	Plasticizer
3,3'-Dimethoxybenzidine	0.180	20.7	115	Dye
Didecyldimethylammonium chloride	0.209	23.8	114	Biocide
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.531	30.9	58	Biocide
Methylbenzethonium chloride	0.438	24.2	55	Biocide
2,4-Dimethylphenol	29.3	1,000	34	Fragrance

- 発育中のオリゴデンドロサイトにおける効力、アストロサイトに対する細胞毒性の欠如、他の細胞型を用いた細胞毒性アッセイにおける効力の欠如に基づいて、細胞毒性化学物質のトップ10をランク付けした

Figure1

e

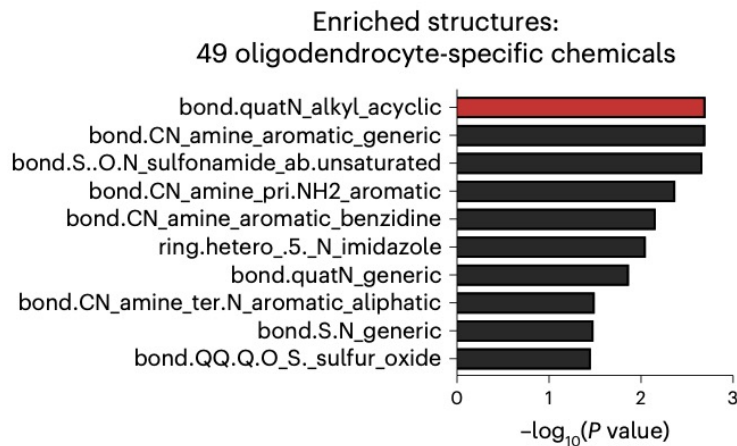


Cytotoxic chemical	Oligodendrocyte cytotoxicity IC ₅₀ (μM)	EPA cytotoxicity median (μM)	Potency score	Use category
Tributyltetradecylphosphonium chloride	0.025	17.1	680	Biocide
Methyltrioctylammonium chloride	0.036	19.6	538	Biocide
Basic Blue 7	0.066	18.9	288	Dye
3,3'-Dimethylbenzidine	3.55	1,000	282	Dye
Diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate	6.42	1,000	156	Plasticizer
3,3'-Dimethoxybenzidine	0.180	20.7	115	Dye
Didecyldimethylammonium chloride	0.209	23.8	114	Biocide
Hexadecyltrimethylammonium bromide	0.531	30.9	58	Biocide
Methylbenzethonium chloride	0.438	24.2	55	Biocide
2,4-Dimethylphenol	29.3	1,000	34	Fragrance

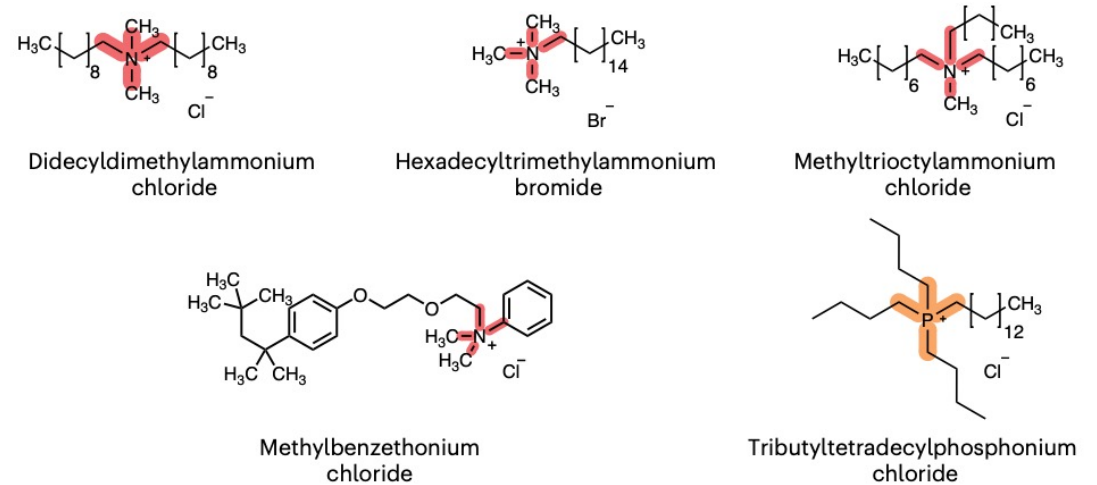
- 各化学物質のEPAデータベースから得られた細胞毒性値の中央値をIC50で割ることにより、効力スコアを算出した

Figure1

f



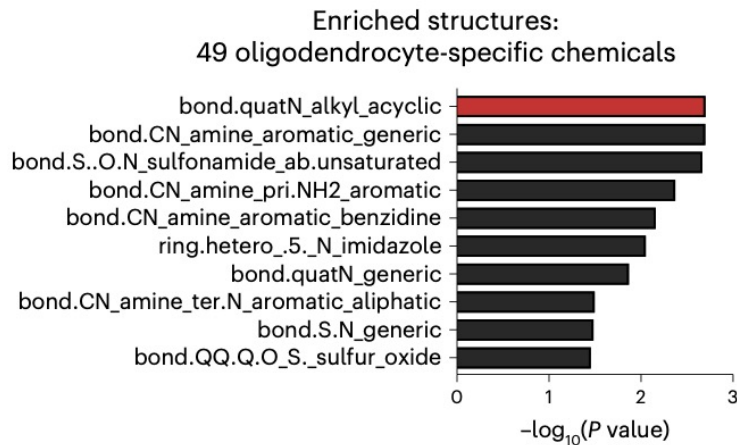
g



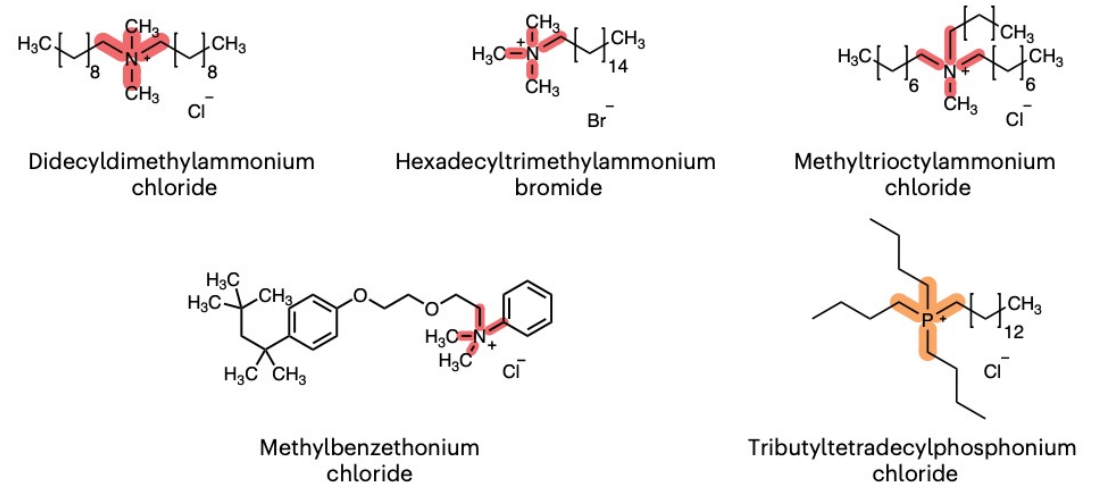
・細胞毒性を示す化学物質の中で、最も多い構造ドメインとして、4つのアルキル基を持つ中心窒素（結合：quatN_alkyl_acyclic）を特徴とする化学構造を同定

Figure1

f

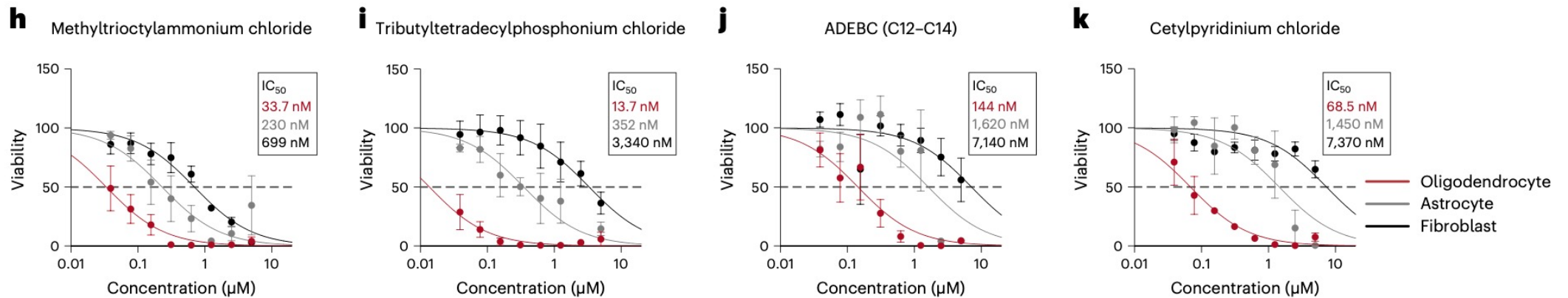


g



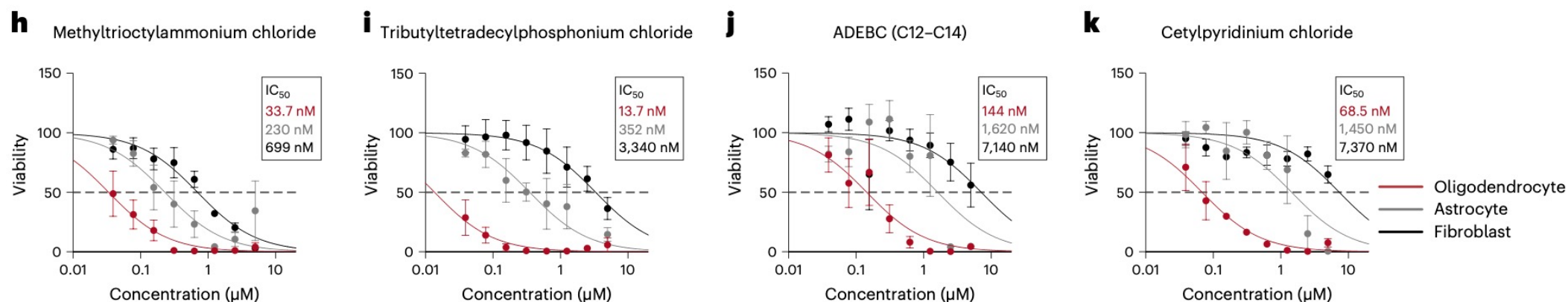
- この結合は1,823の化学物質ライブラリーの中で13の第4級アンモニウム化合物を定義している。
- 一次スクリーニングでは、このうち9つが細胞毒性を示すと同定され、そのうち4つはメチルトリオクチルアンモニウムクロリドを含む上位12種の細胞毒性化合物に含まれている

Figure 1



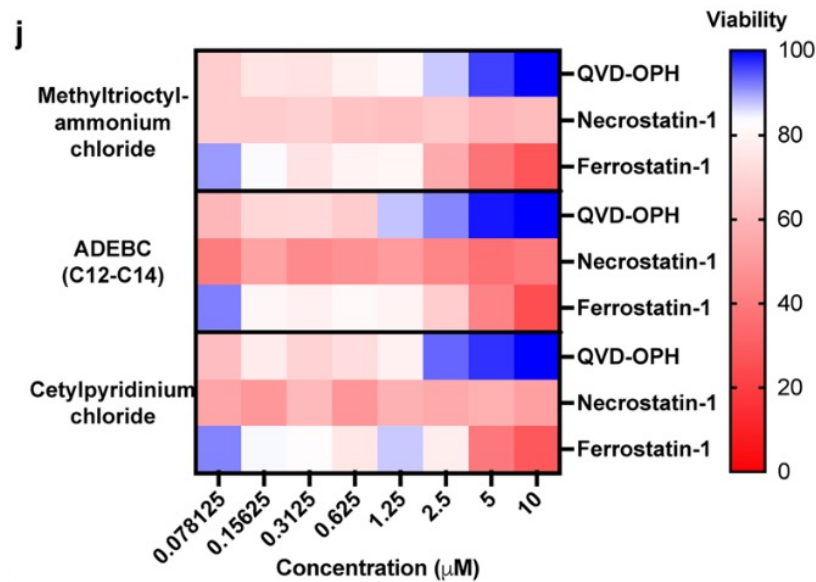
- すべての化合物がアストロサイトと線維芽細胞に対して細胞毒性を示したのは、発育中のオリゴデンドロサイトで細胞毒性が観察された濃度の21倍から100倍高い濃度においてのみであった

Figure1



- 発達中のオリゴデンドロサイトでは、四級化合物による細胞毒性に対して敏感であることが示された。

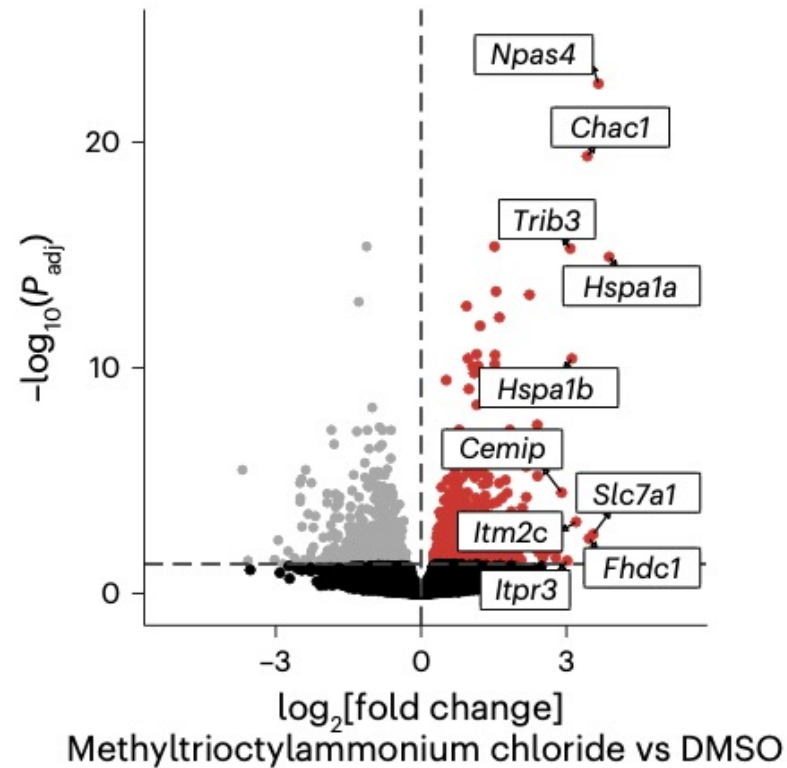
Figure2



- アポトーシス阻害剤であるキノリン-Val-Asp-ジフルオロフェノキシメチルケトン (QVD-OPH) だけが、四級化合物への曝露によって誘導される細胞死を防ぐことができた

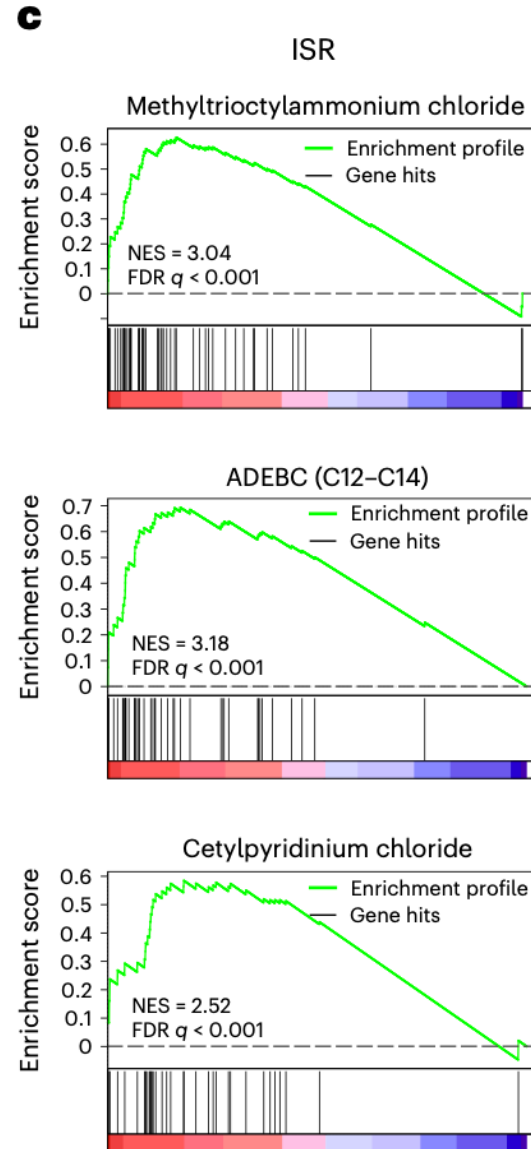
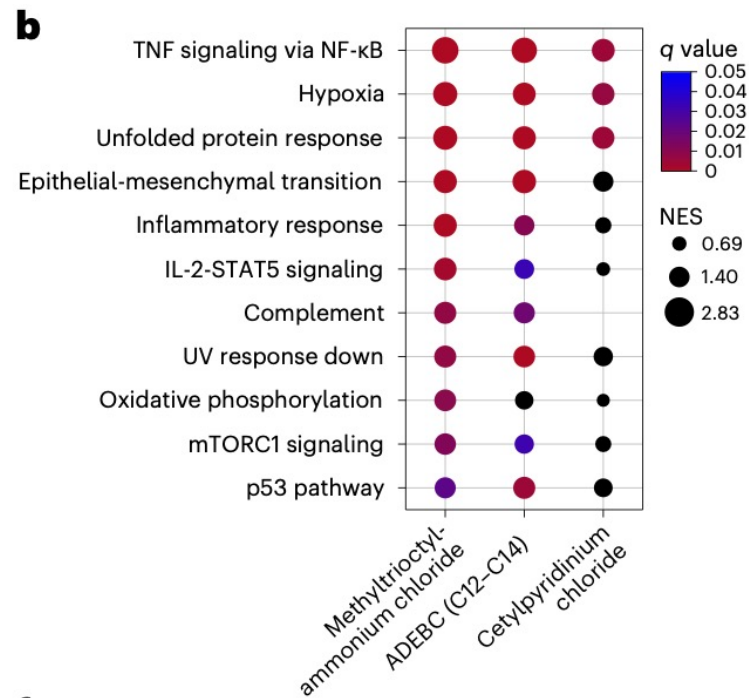
Figure2

a



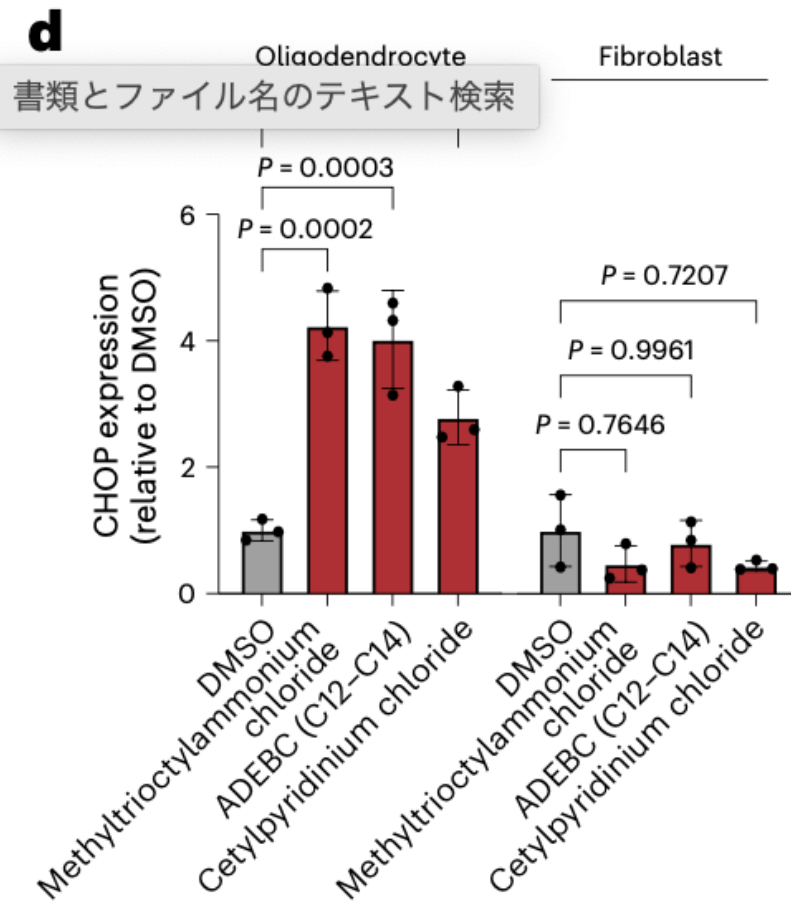
- ・細胞生存率を75%低下させる濃度の塩化メチルトリオクチルアンモニウム処理後の発現差遺伝子のボルケーノプロット

Figure2



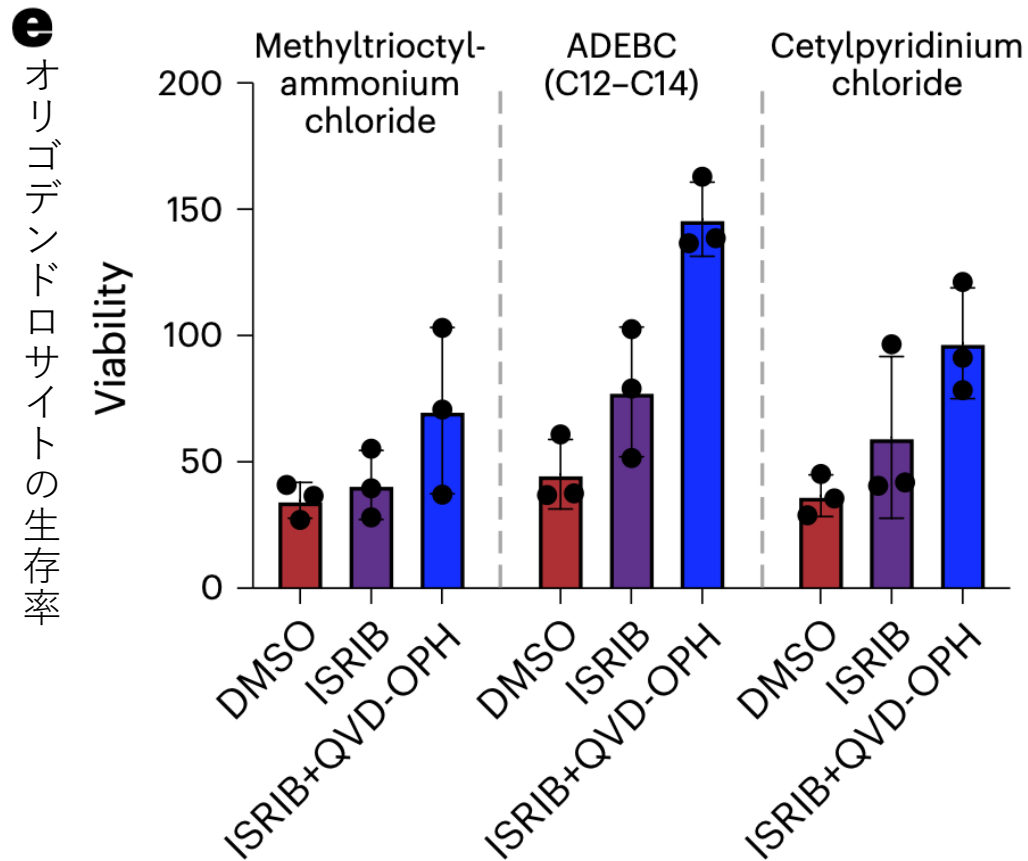
・ GSEAにより、4級化合物に暴露されると、プログラム細胞死、アンフォールドタンパク質応答、統合ストレス応答 (ISR) に関与する遺伝子セットの発現が強化されることがわかった

Figure2



- ISR誘発アポトーシスのメディエーターのタンパク質 (CHOP) をコードする遺伝子 *Ddit3* についてqPCRを行い、四級化合物がISR活性化を誘発することを確認した (オリゴデンドロサイトのみ)

Figure2



QVD-OPH：四級化合物への曝露によって誘発される細胞死を防ぐことができるアポトーシス阻害剤

ISRIB：ISR阻害剤

Figure2

- 四級化合物によるISR誘導は、NF- κ Bとp53シグナル伝達を阻害する作用分子であるオリゴデンドロサイトに特異的である可能性が示唆された

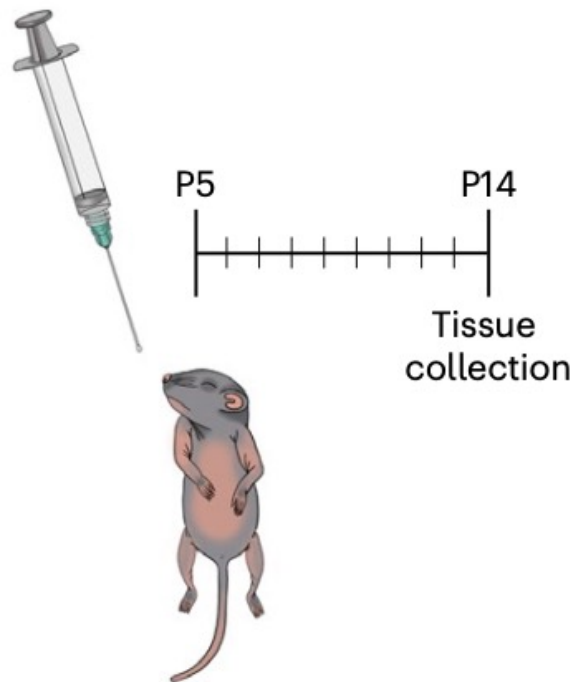
NF- κ B(Nuclear factor)は、炎症、細胞増殖、細胞の生存を調節する遺伝子の制御に関わる転写因子。

Figure2

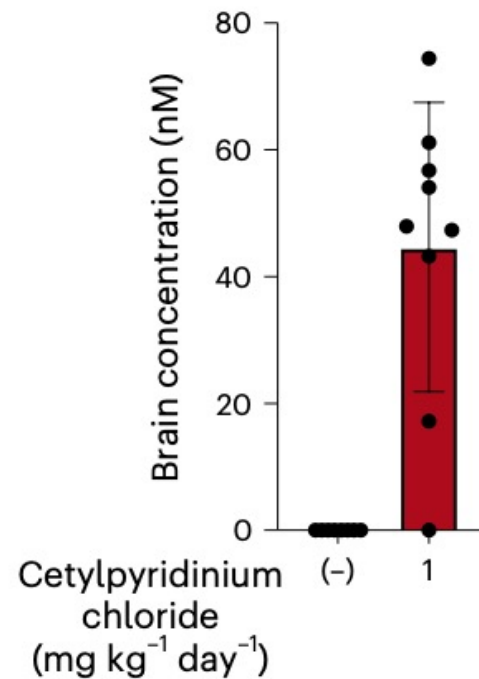
- 第四級化合物（塩化メチルトリオクチルアンモニウム、塩化セチルピリジニウム、ADEBC）は生後血液脳関門を通過できた

Figure2

f

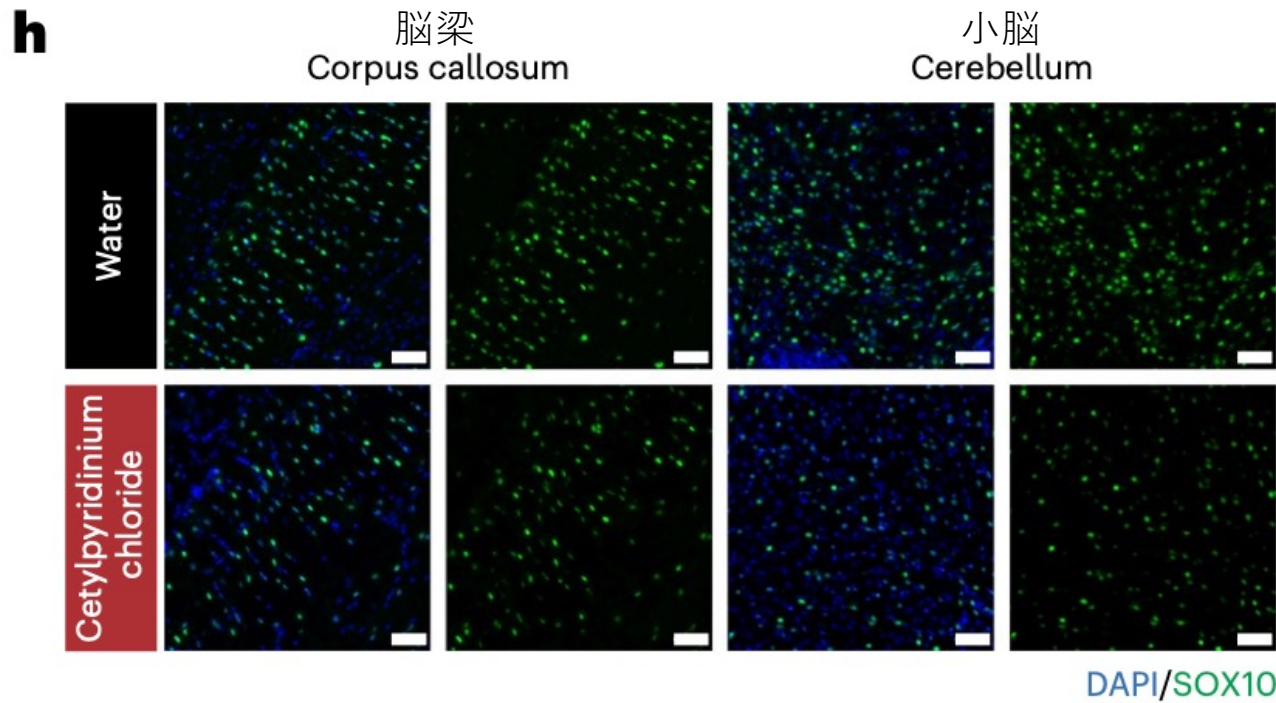


g



- 塩化セチルピリジニウムをオリゴデンドロサイトの発生と髄鞘形成に不可欠な時期であるP5からP14までの10日間投与
- 10mg/kg・1日投与したマウスは死亡
- 1mg/kg・1日投与したマウスは肉眼的発育に変化なし

Figure2



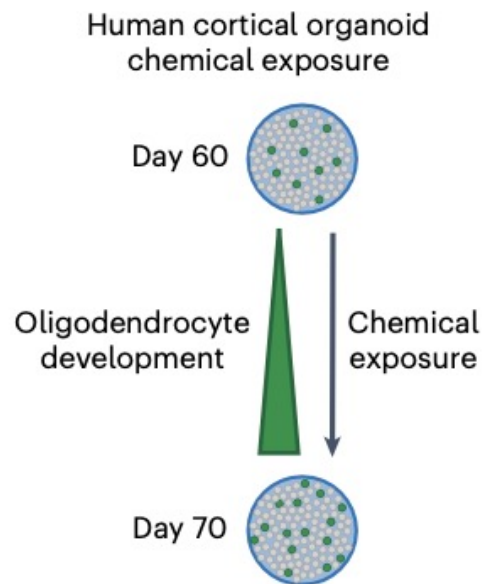
・ 脳梁、小脳、大脳皮質、海馬を含む複数の脳領域で、SOX10+オリゴデンドロサイト系細胞が著しく減少している

Figure2

- 第四級化合物がin vivoでの生後発達中のオリゴデンドロサイトに特異的にリスクをもたらす

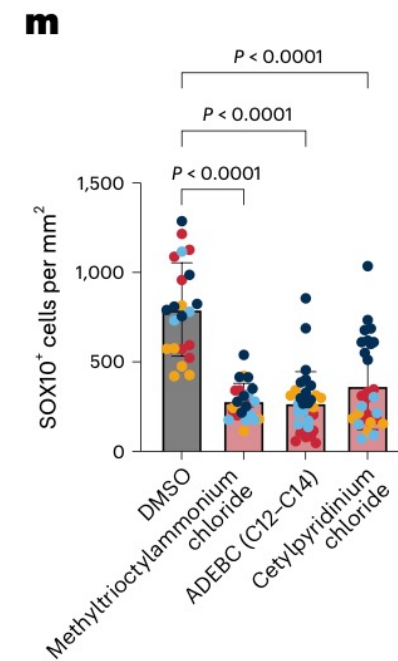
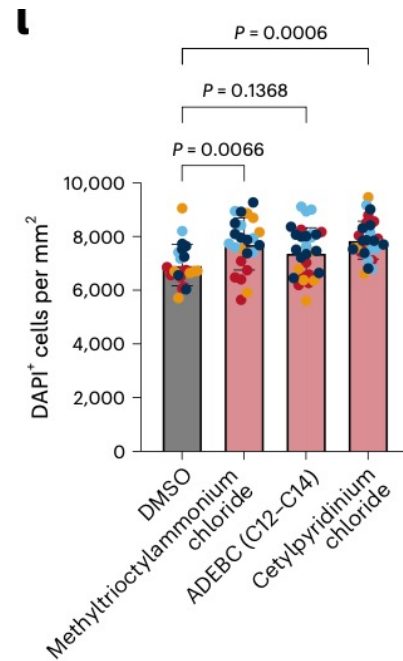
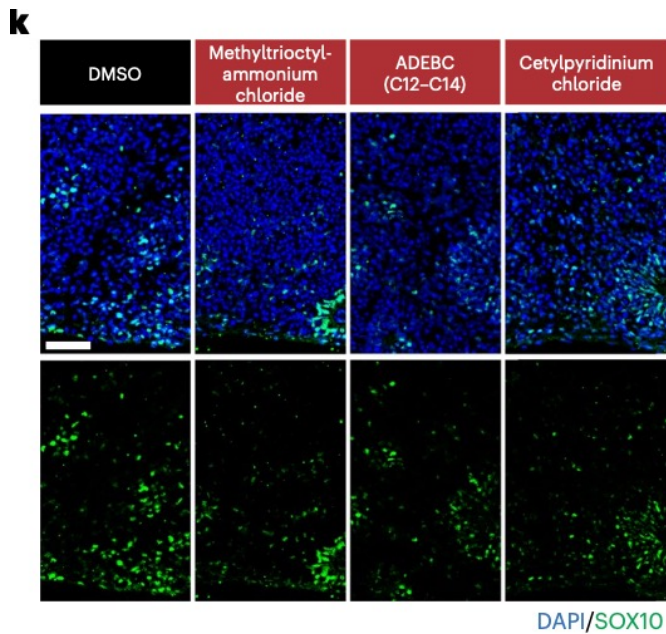
Figure2

j



- ヒト多能性幹細胞（hPSC）由来の領域化神経オルガノイドモデルを利用
- オリゴデンドロサイトの発生に重要な時期に、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリド、**ADEBC**を培地に**10日間**補充した

Figure2

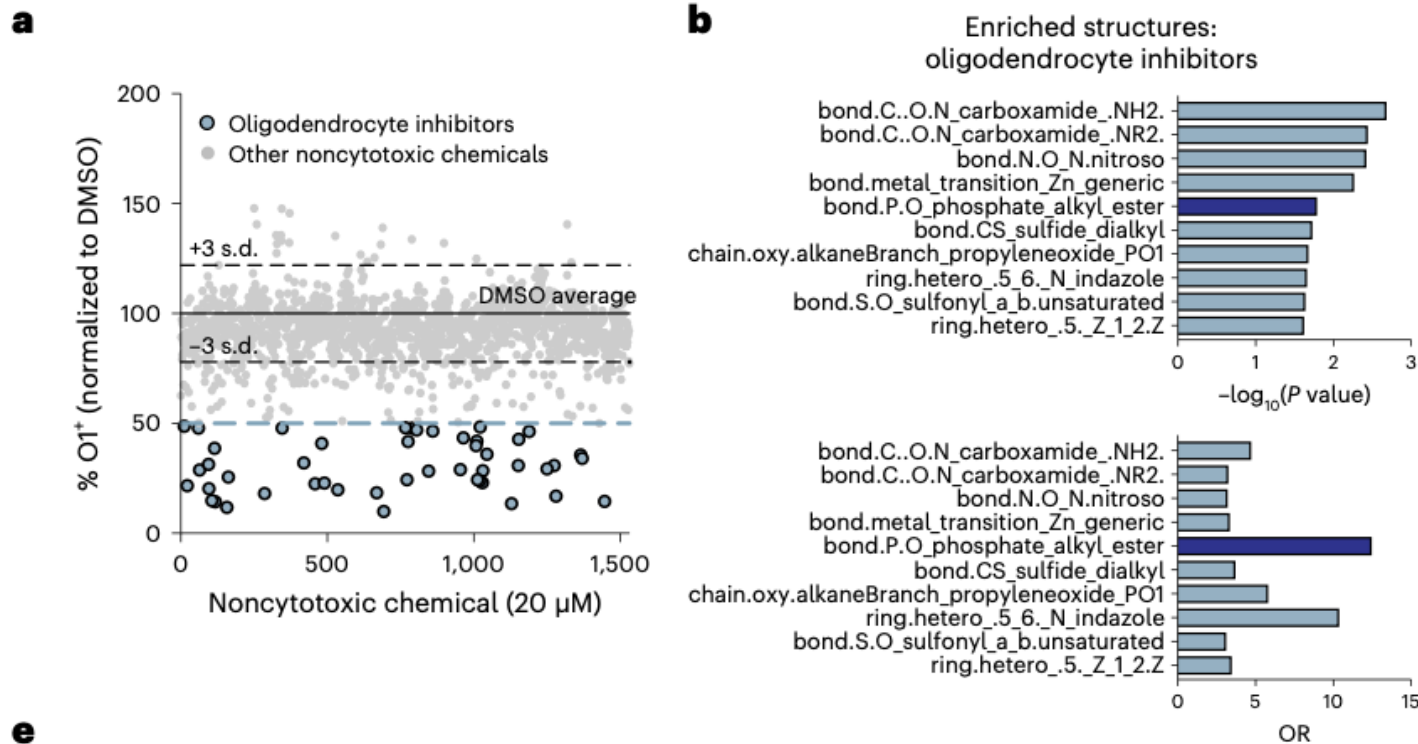


- SOX10+ OPC(オリゴデンドロサイト前駆細胞)とオリゴデンドロサイトの密度は著しく減少していた

Figure2

- 四級化合物が初期脳発達のin vitroモデルにおいて、ヒトオリゴデンドロサイト系に属する細胞に特異的に選択的に細胞毒性を示す

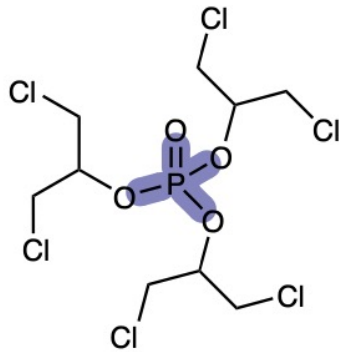
Figure3



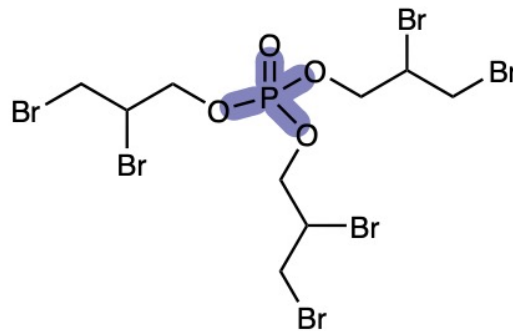
・オリゴデンドロ
サイトの発生阻害
剤の多くは中心リ
ン酸をもつ構造を
している

Figure3

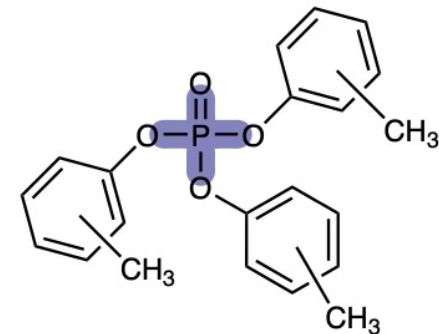
c



TDCIPP



TBPP

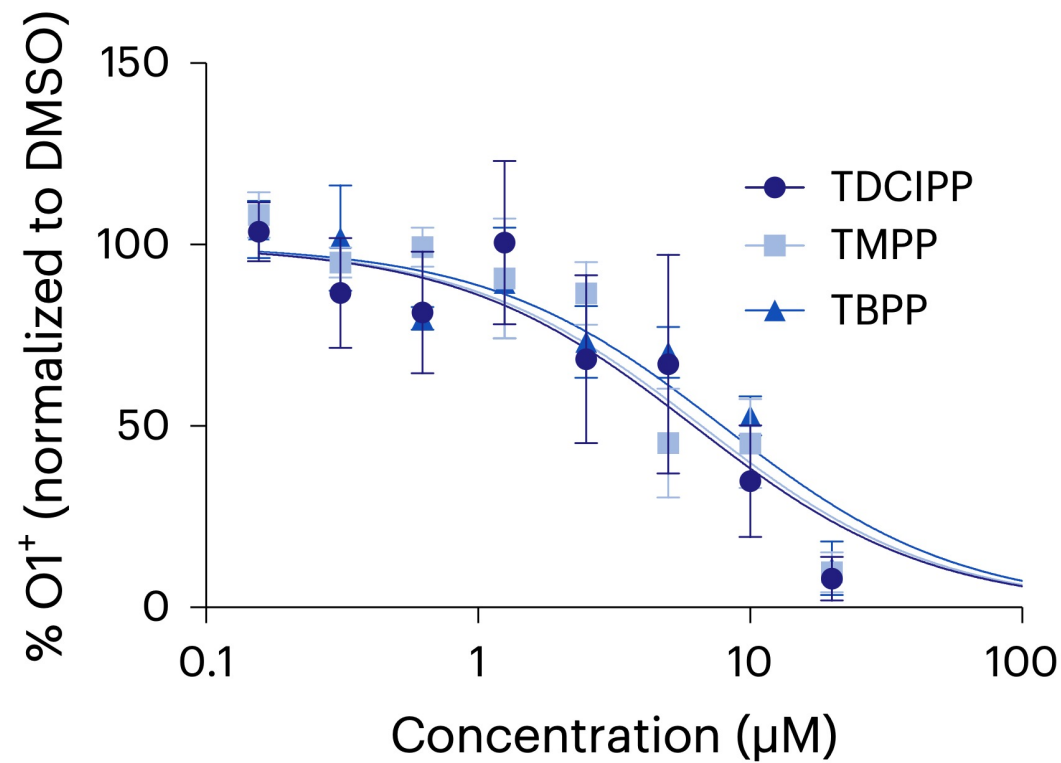


TMPP

・すべて有機リン酸エステルで、殺虫剤としても難燃剤としても広く使用されている

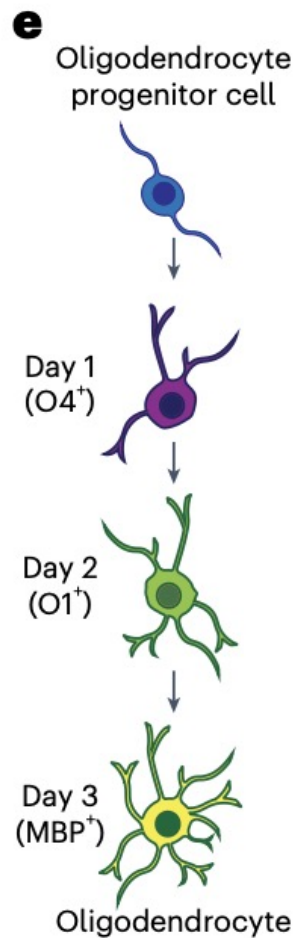
Figure3

d



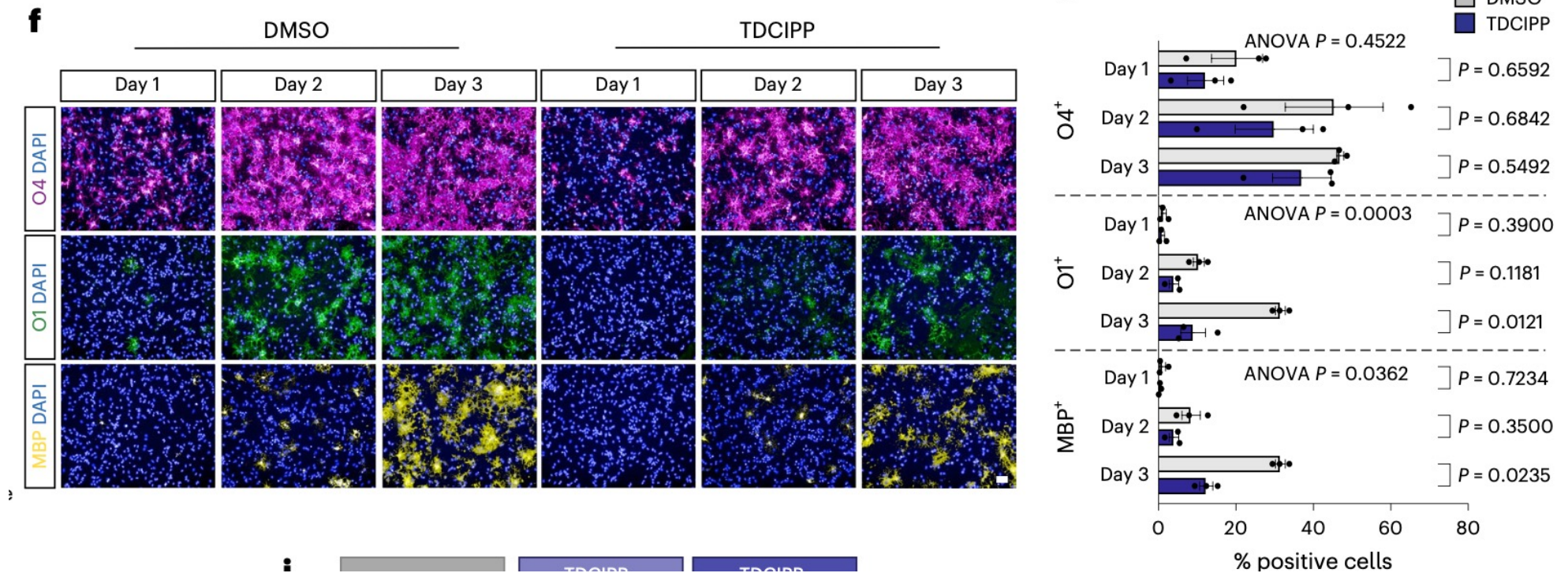
- ・ 8点用量反応アッセイ (30 nM~20 μM) で試験し、 IC50値を算出した

Figure3



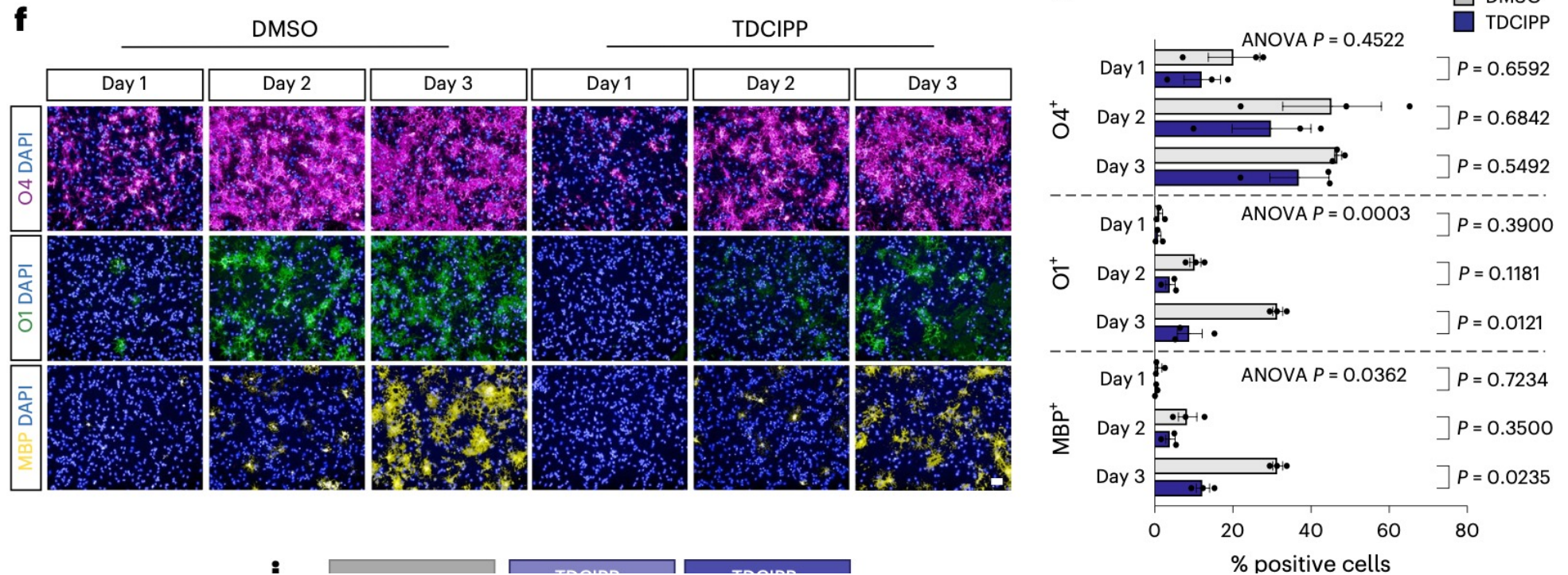
- 初期オリゴデンドロサイトはO4の抗原を発現
- 中間オリゴデンドロサイトはO1の抗原を発現
- 成熟オリゴデンドロサイトはミエリン塩基性タンパク質（MBP）を発現

Figure3



・発育中のオリゴデンドロサイトをTDCIPP、TMPP、TBPP存在下で培養し、3日間かけて成熟度を評価した

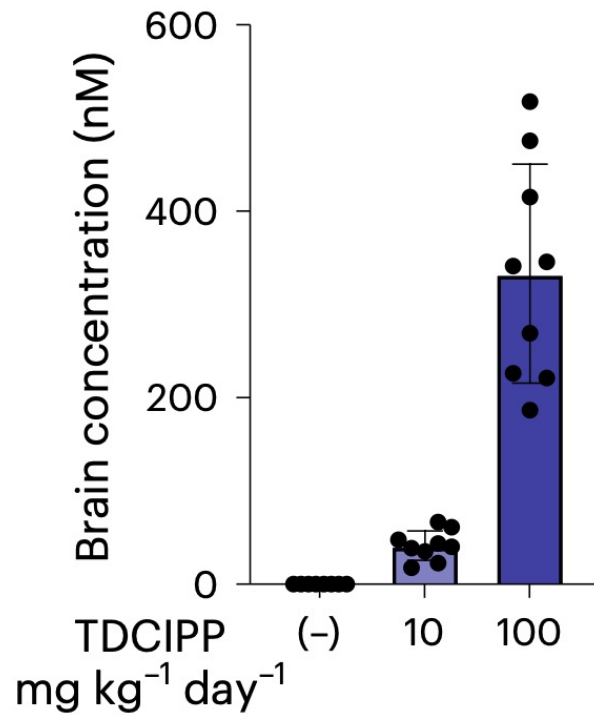
Figure3



・有機リン系難燃剤が、初期オリゴデンドロサイトから中間オリゴデンドロサイト、成熟オリゴデンドロサイトへの初期進行を停止させるメカニズムを示している。

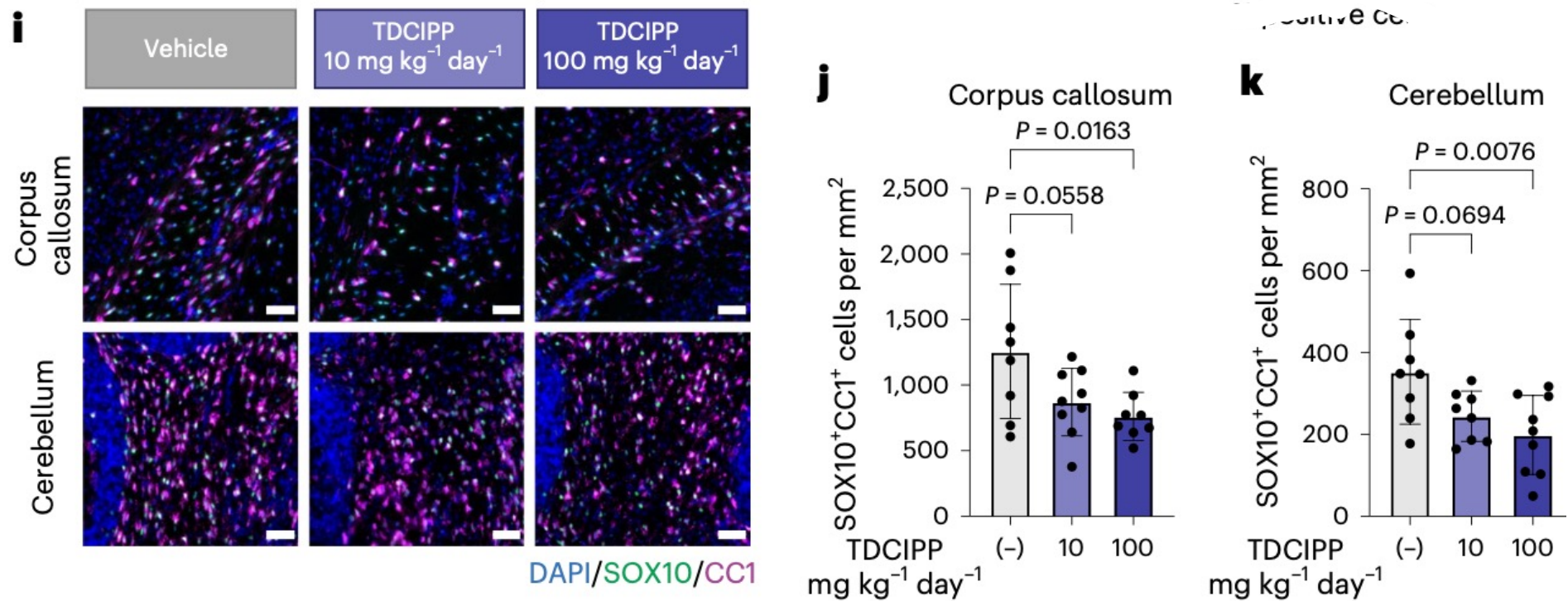
Figure3

h



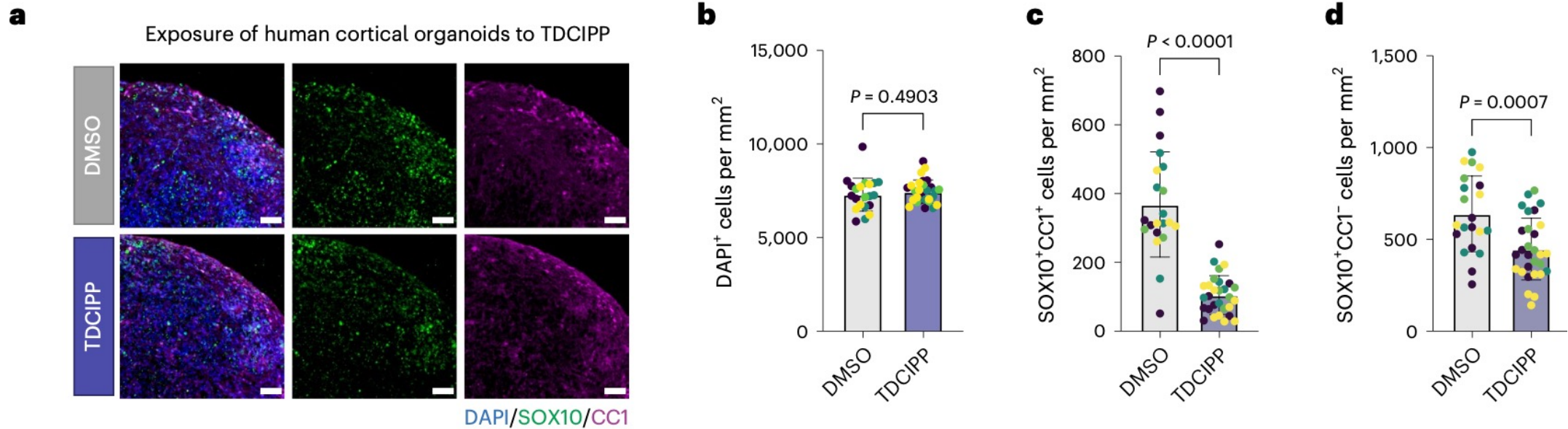
- ・ TDCIPPをP5からP14まで毎日マウスに経口投与した
- ・ 体重、脳重量、肝臓重量に有意な変化は認められなかった
- ・ TDCIPPは肝臓組織だけでなく脳組織にも検出された

Figure3



- P14においてオリゴデンドロサイトの数は脳梁や小脳を含むTDCIPP投与マウスの脳で有意に減少していた

Figure4

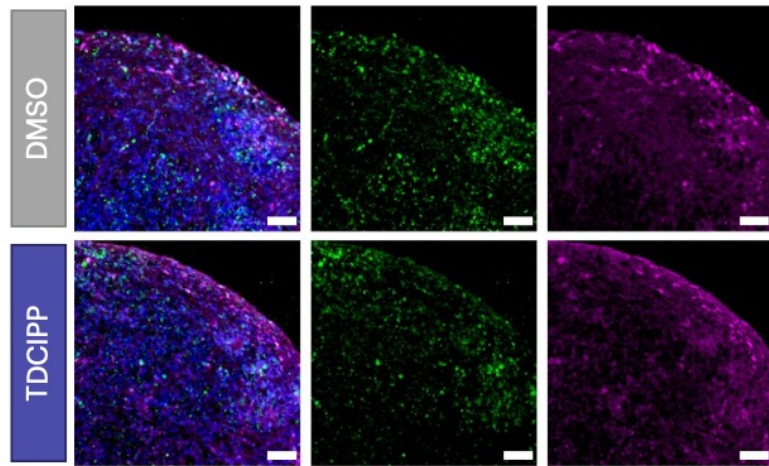


- ・ ヒト皮質オルガノイドモデルを用いて、有機リン系難燃剤がヒトオリゴデンドロサイトの発達を阻害するかどうかを評価
- ・ TDCIPP存在下でオルガノイドを60日目から70日目まで培養した

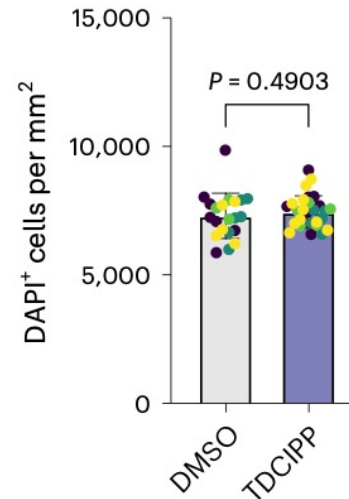
Figure4

Exposure of human cortical organoids to TDCIPP

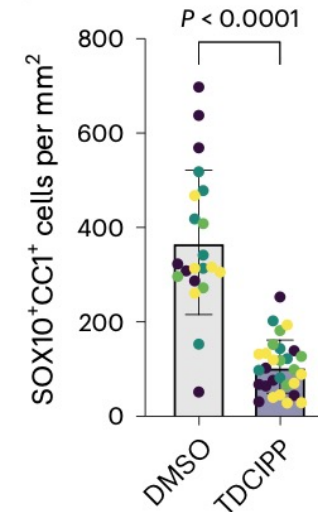
a



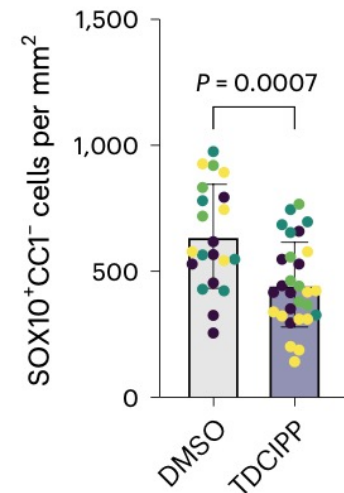
b



c



d



・ TDCIPP存在下でオリゴデンドロサイトは70%以上有意に減少した (c)

・ オリゴデンドロサイト前駆細胞も30%減少した (d)

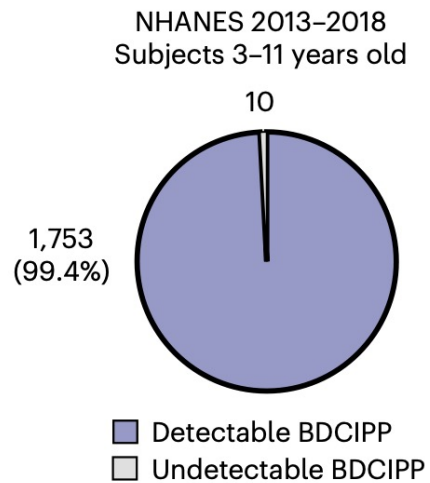
→これはオリゴデンドロサイトが成熟しなかったためにOPCプールが枯渇したか、あるいは有機リン系難燃剤に長時間暴露されたことによる直接的な毒性に起因すると考えられた

Figure4

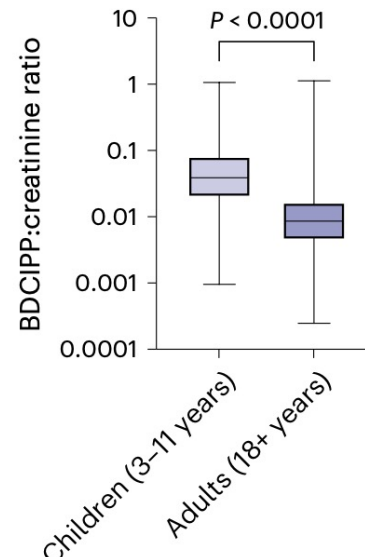
- TDCIPPの存在はヒトのオリゴデンドロサイトの発生を停止させることが示唆された

Figure4

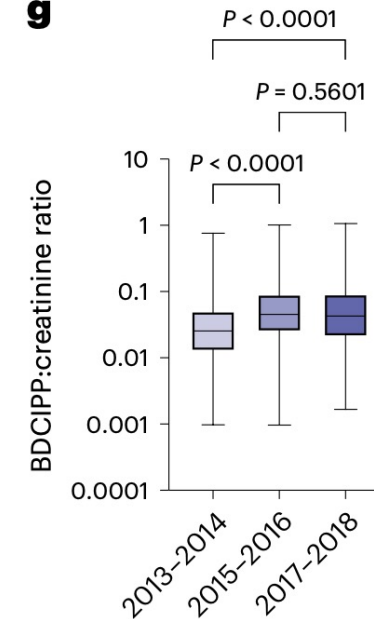
e



f



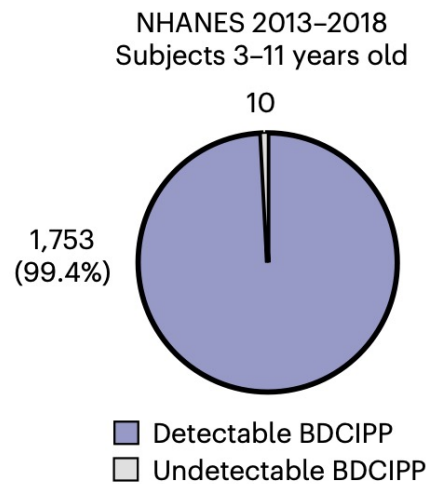
g



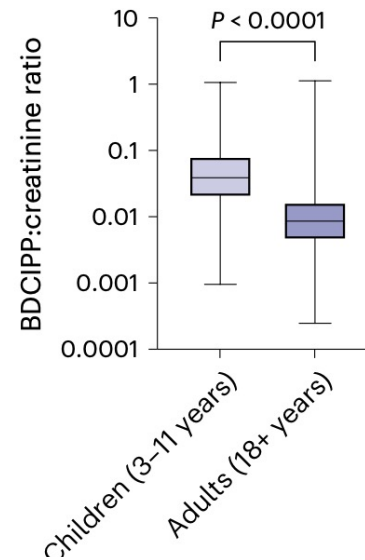
- 尿中の代謝産物であるビス（1,3-ジクロロ-2-プロピ°）ホスフェート（BDCIPP）が、有機リン系難燃剤TDCIPPへの曝露を正確に推定できる

Figure4

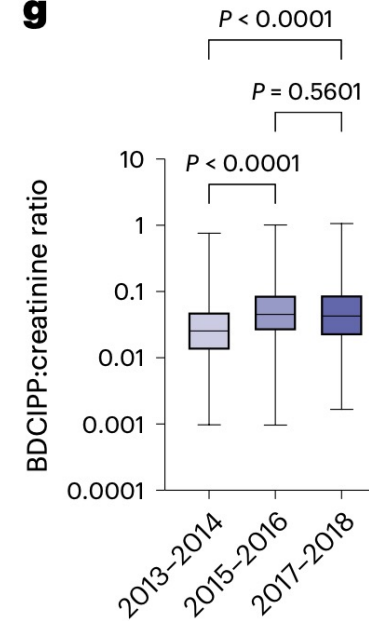
e



f



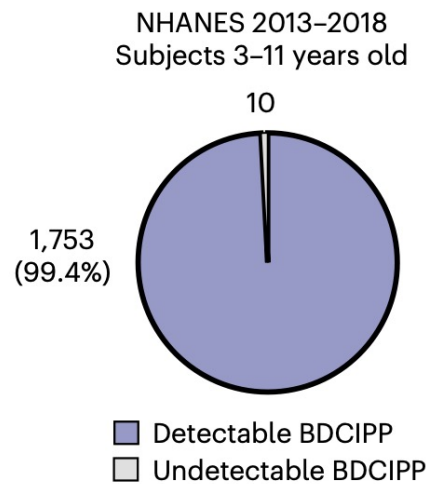
g



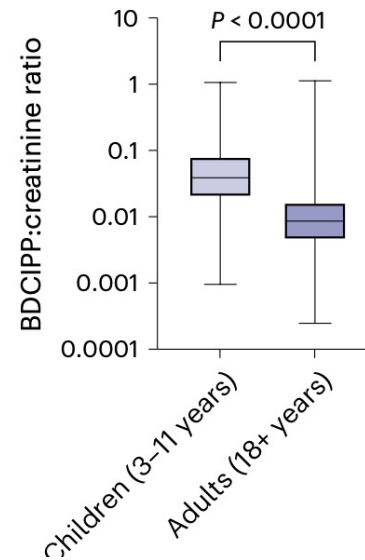
- 小児1,763人中1,753人（99.4％）の尿検体にBDCIPPが検出された（e）

Figure4

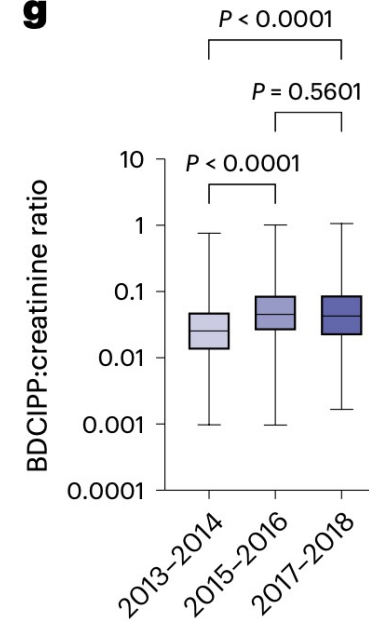
e



f



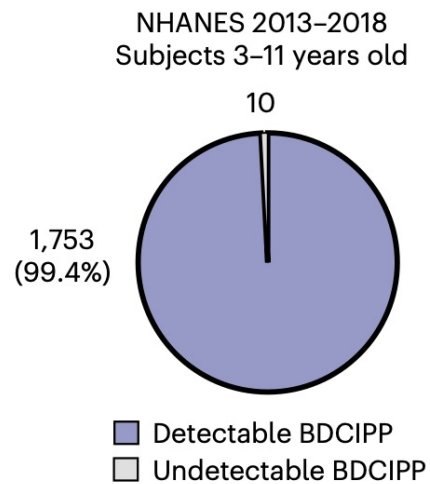
g



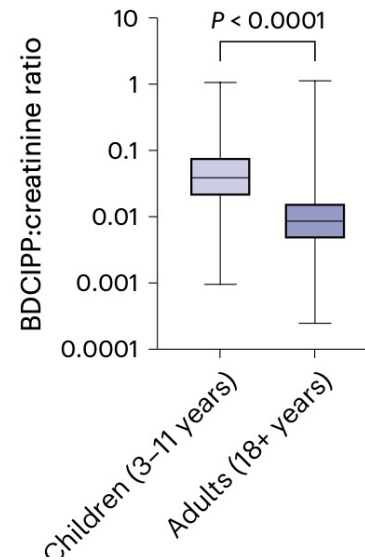
- 小児のクレアチニン調整BDCIPP量は成人と比較して有意に高い (f)
→ 難燃剤内部被曝量は小児でより高い可能性あり

Figure4

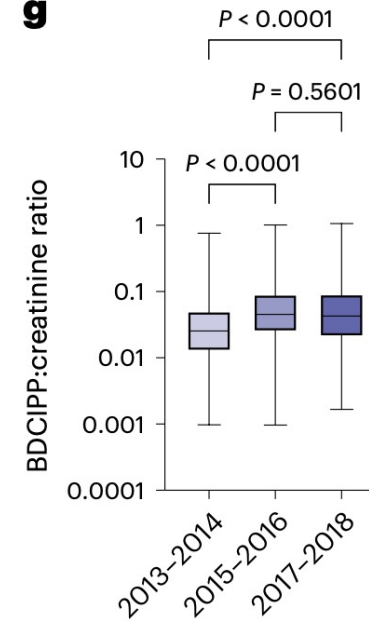
e



f



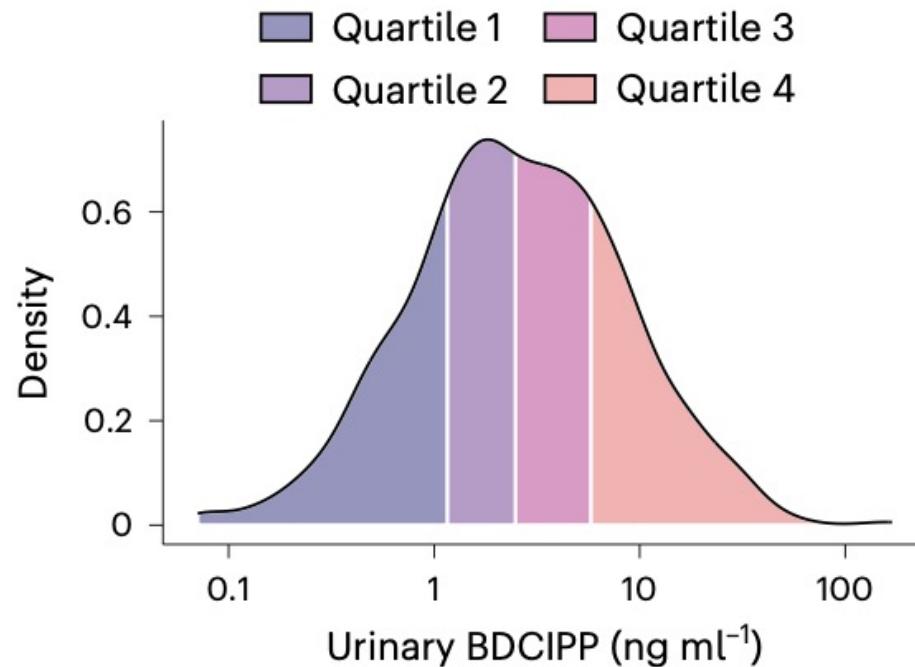
g



- 小児期の有機リン系難燃剤への曝露が年々増加している可能性が示された (g)

Figure4

h



- 3～11歳の小児の尿中BDCIPP濃度と、2つの神経発達指標である粗大運動機能障害および特別教育の必要性との関連を調べた

Figure4

i

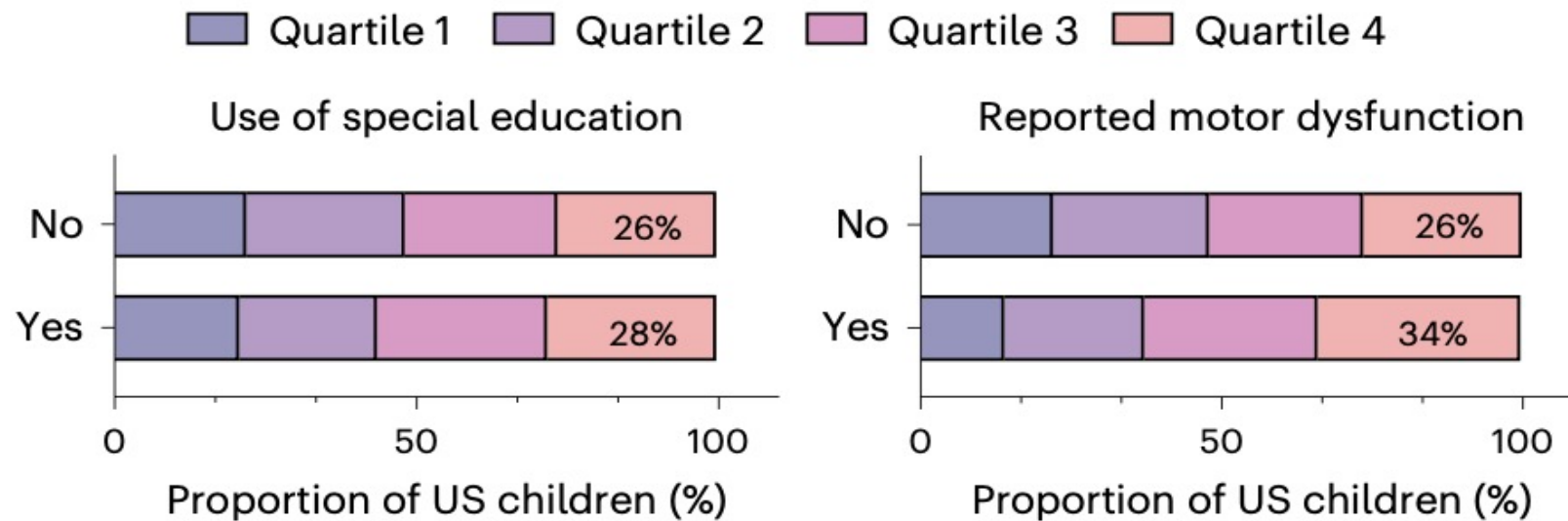
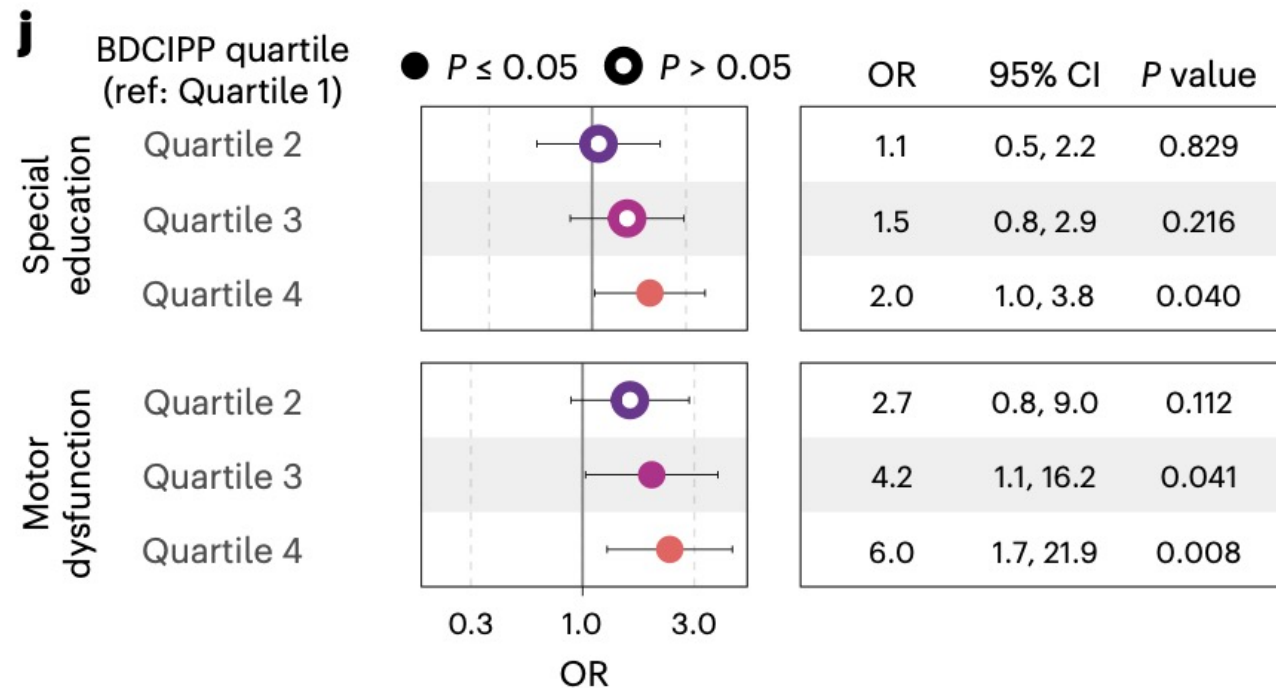
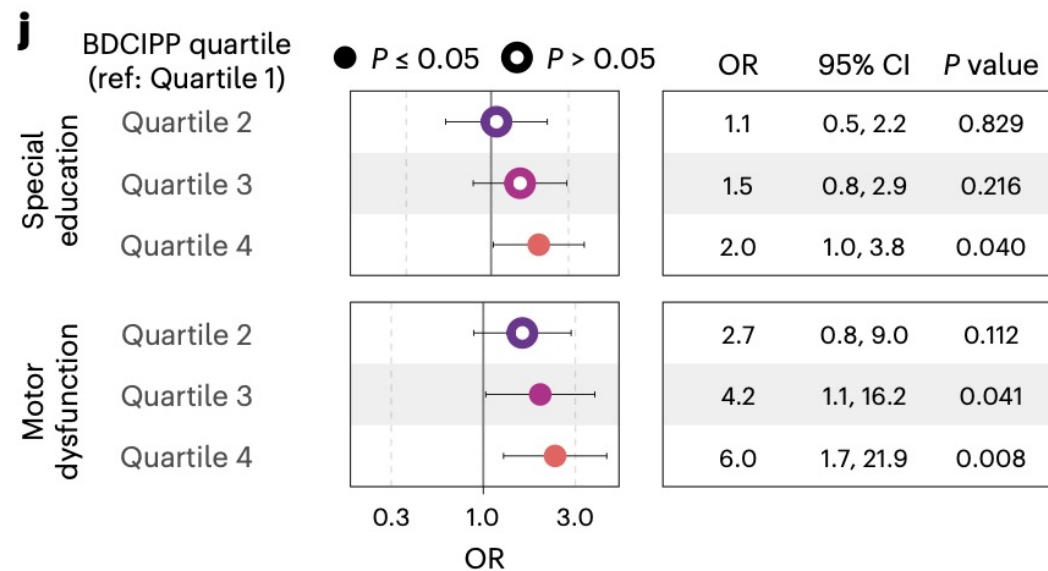


Figure4



- 多変量調整ロジスティック回帰を用いると、高濃度の尿中BDCIPPと両神経発達指標との間に有意な関連が確認された

Figure4



- 曝露量が多い子どもは、曝露量が少ない子どもに比べて、神経発達に有害な結果を経験する可能性が2倍から6倍高いことを示している

→有機リン系難燃剤曝露と神経発達異常との間に正の関連があることを示す強力な証拠

まとめ

- マウスとヒトのオリゴデンドロサイトの生成を阻害する2種類の化学物質、第四級化合物と有機リン系難燃剤を同定した
- どちらも日常生活で触れる環境に多く存在する
- 神経発達毒性に関する重大な健康上の懸念
- この研究の結果は、化学物質への曝露を減らし、人の健康を守るための規制や行動介入に関する決定に役立つ科学的基盤に貢献する