

## 第10期採択課題

# 学習記憶障害をもたらすグルタミン酸受容体結合化合物の発達神経毒性・神経毒性を評価するインビトロ試験法の構築

研究代表者

関野祐子 NPO法人イノベーション創薬研究所・東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

研究分担者 山崎博幸 群馬医療福祉大学・社会福祉部・准教授

金村米博 国立病院機構大阪医療センター 先進医療研究開発部 部長

山崎大樹 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第2室長

小金澤紀子 群馬大学・院・医学系研究科・薬理学分野・助教

# 現行の神経毒性試験法の問題点と新規試験法のコセプト

## 現行の試験法の問題点

- 化学物質や医薬品の神経毒性試験・発達毒性試験の検査項目は、個体の行動観察(FOB)、学習記憶試験、神経病理試験などからなり、試験にかかる動物数や時間が膨大である。
- *In vitro*実験系に関しては神経細胞死を評価する方法はあるが、学習記憶に直結するシナプス機能を評価する*in vitro*実験法はまだない。

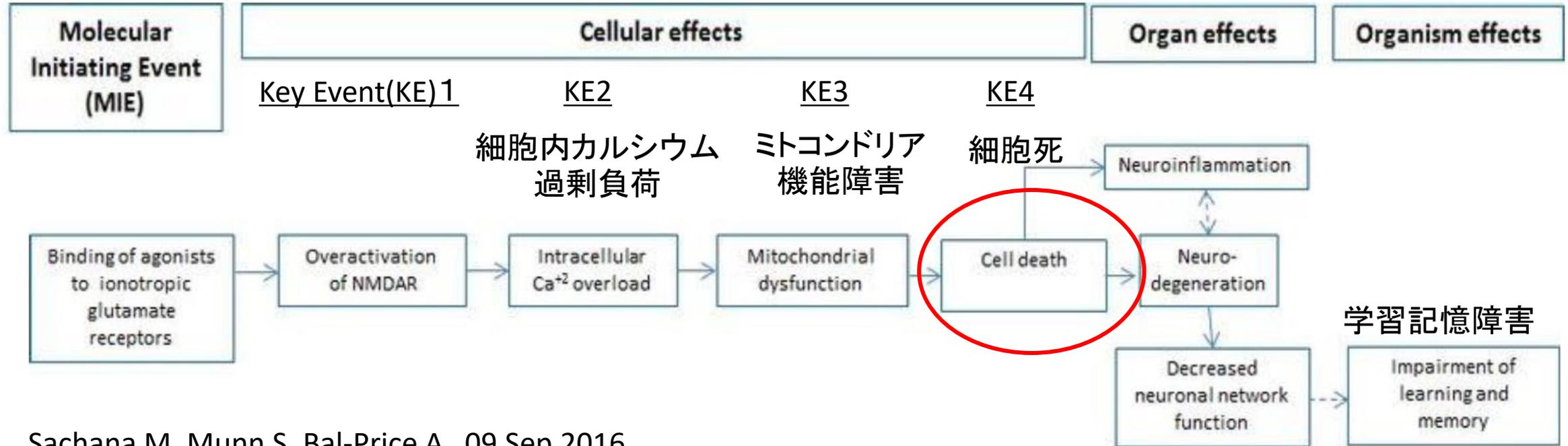
## 研究課題で提案する新規試験法のコセプト

- 初代培養神経細胞やヒトiPS細胞を利用して、学習記憶メカニズムに直結するシナプス機能を評価する安価で迅速な*in vitro*試験法を開発する。
- 神経細胞死ではない、神経毒性の評価を行う。
- 培養中のばく露によりシナプス形成期への毒性を評価する。

# 学習記憶障害をもたらす有害性発現経路(AOP)の1例:細胞死がKE

AOP: Adverse Outcome Pathway

【AOP No. 48】 Adverse Outcome Pathway on binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain leading to excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment.



Sachana M, Munn S, Bal-Price A 09 Sep 2016

# 神経毒性の強度と障害レベル：神経細胞死前の機能異常

重度

神経細胞死

- 不可逆的で生命の危機に直結する

神経回路網異常

- 意識障害（癲癇）

シナプス機能異常

- 記憶障害（アルツハイマー病など）

原因不明

- 倦怠感など

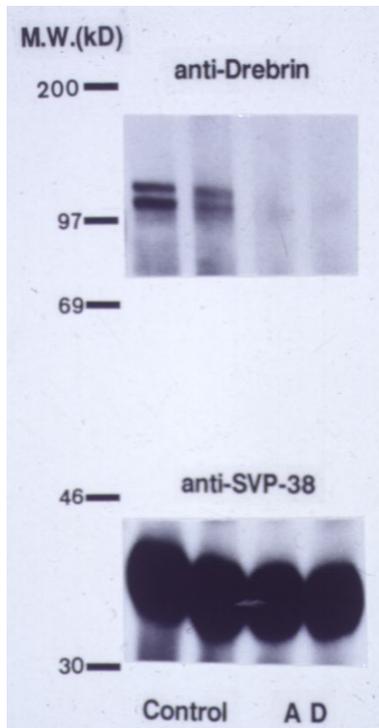
軽度

神経細胞死の評価は最も重篤な神経毒性であり、学習記憶障害を評価するためには、シナプス機能不全を定量的に評価できる試験法が必要である。

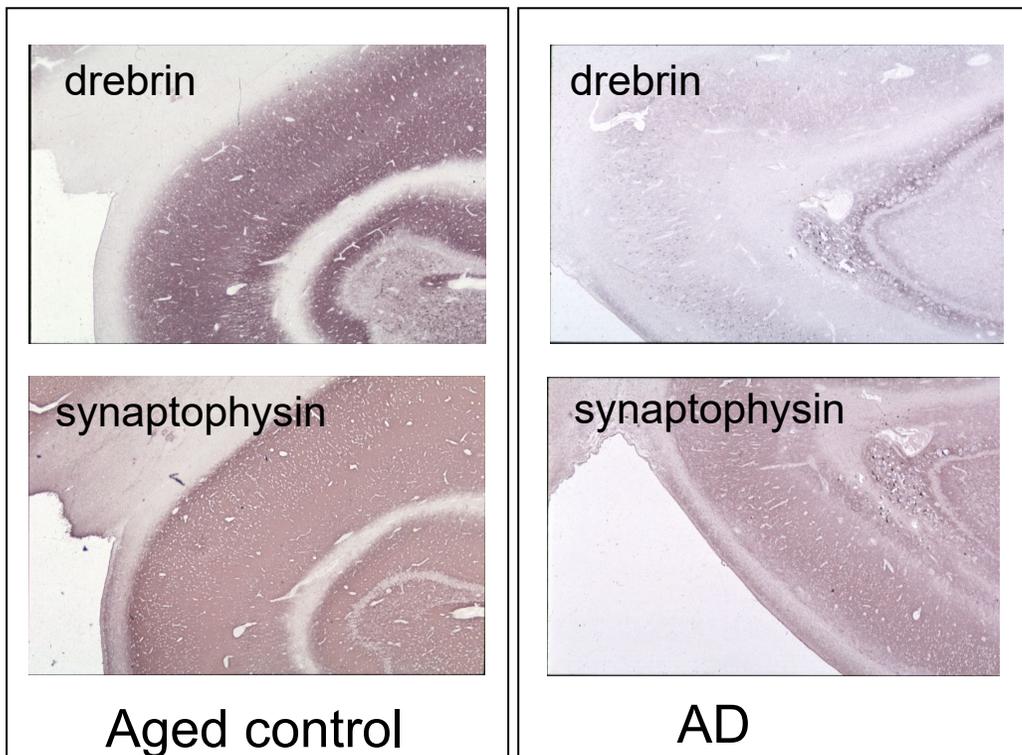
# シナプス後部アクチン細胞骨格の消失に発生する認知機能障害

## ● アルツハイマー病死後脳の研究 Harigaya et al., *J Neurosci Res* (1996)

### Western Blotting



### Immunohistochemistry of Hippocampus



シナプトフィジンの発現量と免疫組織染色強度が維持されていることから、神経細胞死のレベルは低く、**シナプス結合は維持されていると推察できる。**一方、**シナプス後部構造のアクチン細胞骨格が減少している。**

化学物質による学習記憶機能への有害反応を調べるために、免疫組織染色や免疫細胞染色で**ドレブリン**発現量を調べることで記憶障害などの機能不全がわかる。

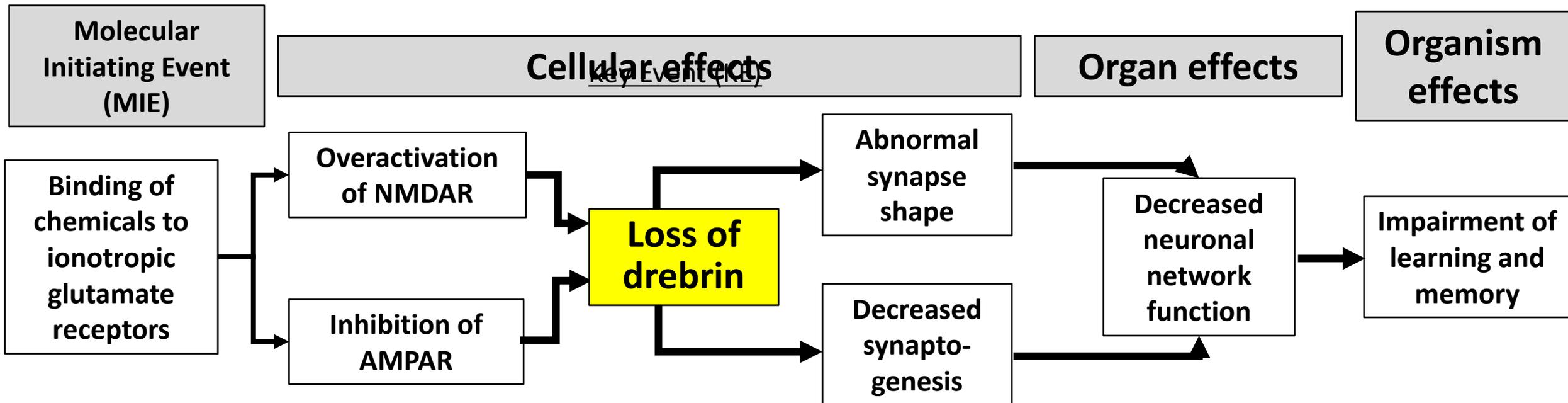
## ドレブリン発現量と記憶との関係:その他のエビデンス

- 放射線やshRNAでドレブリンを減少すると学習機能が低下する。
- ドレブリンノックアウトマウスには学習機能障害がみられる。

# ドレブリンの発現量変化をKEとするAOPの提案（第8期）

学習記憶障害はシナプス機能不全（シナプス部位に起こる機能的構造的障害）で起こることから、“Loss of drebrin”をCellular effectsのKey Event（KE）とする。

MIEとして化合物のNMDA型グルタミン酸受容体への結合を挙げているAOP48, AOP13などと比較するとKEが試験法が簡素で定量性が高くなる。

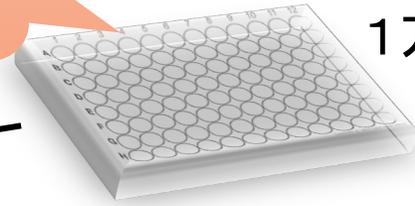


# 第10期の達成目標

- ① 神経細胞のドレブリンの量と局在を定量解析するため、頑健でスループット性の高い神経細胞培養実験プロトコルで薬液投与プロトコルを最適化し、細胞密度を決定を行う。
- ② 免疫細胞化学染色像の画像処理アルゴリズムの改良 輝度分布解析法を確立する。
- ③ 画像の機械学習により、化合物の有害事象を予測するAIシステムの構築を行う。
- ④ 神経細胞特異的アクチン結合タンパク質ドレブリンの消失をKey Event(KE)とする発達神経毒性や学習記憶障害を有害事象(AO)とする有害性発現経路(AOP)のOECDへの提案作業を開始する。
- ⑤ ヒトiPS細胞由来神経細胞を利用した実験動物を利用しない実験系の構築を目指す。

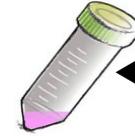
# 発達神経毒性・神経毒性を評価する頑健な神経細胞培養系の確立 薬液投与プロトコルを最適化

平面性の高いCOPプレート(Z社・非売品)画像時間が4分の1に。



細胞播種  
1万個/穴

細胞数測定



細胞融解

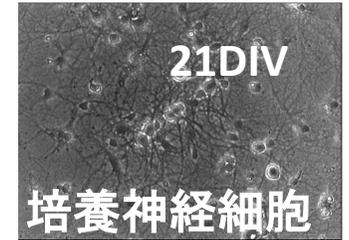
解剖技術に左右されないサンプルで、ロットごとに品質チェックされた。SKYニューロン



凍結神経細胞  
ラット胎仔  
(E17)の海馬

無血清培養(3週間)

培地交換の必要がない。



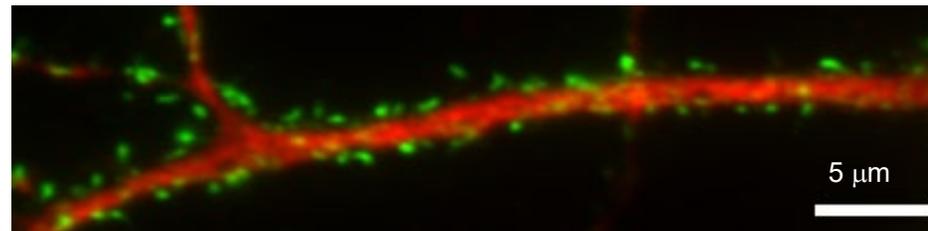
21DIV  
培養神経細胞

薬物投与 温度変化  
のないうちに薬液投与  
する必要がある。

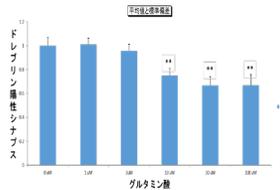
免疫染色  
(drebrin, MAP2, DAPI)

ハイコンテンツアナリシス

画像取得・解析の完全自動化により、再現性が向上する



安定した培養の実現  
細胞密度とデータ再現性を詳細に検討した。

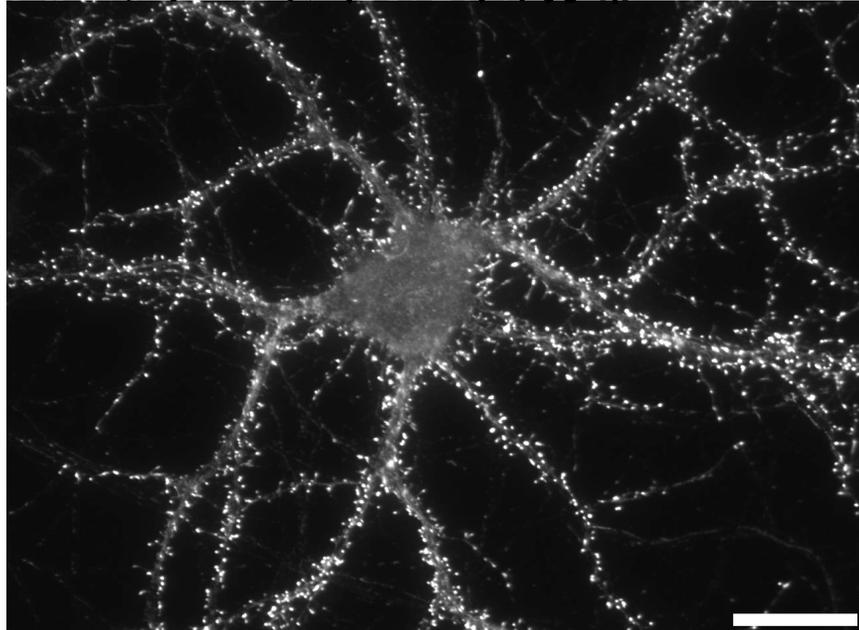


# グルタミン酸の急性効果に関する解析

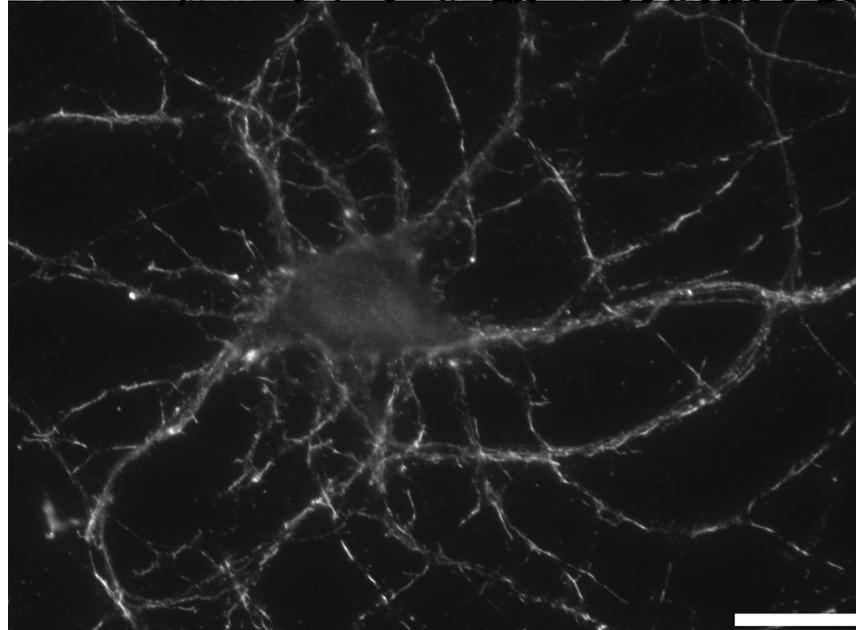
# ドレブリンクラスタ数の定量的解析

## グルタミン酸受容体刺激によりドレブリンクラスタが消失

A. コントロール(DIV21)の分布



B. 100  $\mu$ M グルタミン酸 10分間投与後



ラット海馬培養神経細胞のドレブリン分布:NMDA受容体刺激による局在変化

A; 樹状突起スパインにドレブリンが局在しているため、ドレブリンクラスタとして定量的に測定することが出来る。

B. グルタミン酸を投与すると、ドレブリンがスパインから樹状突起の幹の方に移動する。ドレブリンクラスタ数の減少として定量的に評価できる。

この現象は、Mo Cell Neurosci 200631:493-504に発表以後、培養細胞の品質評価に用いている。

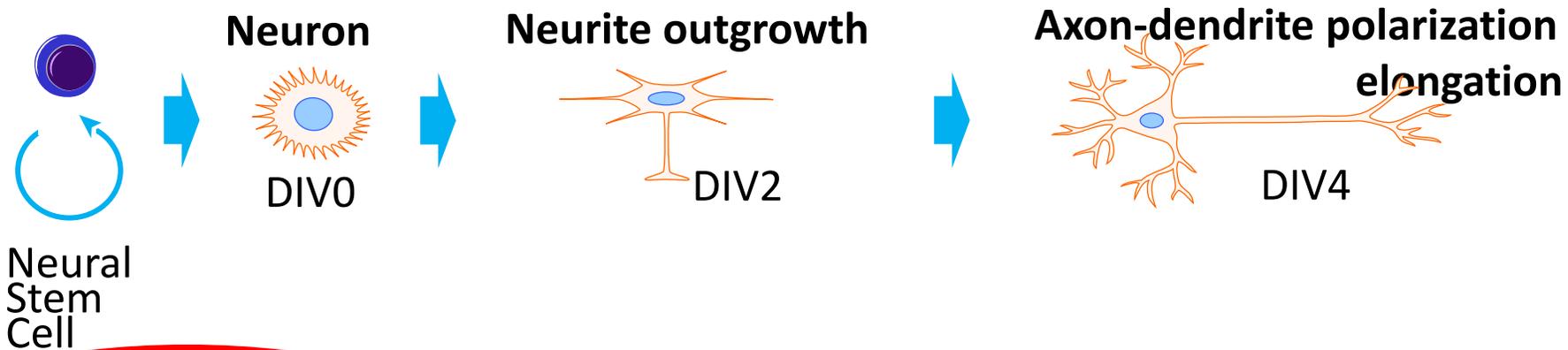
# 再現性の高い結果をえるためのプロトコル確立：結果のまとめ

- ① 神経細胞のドレブリンの量と局在を定量解析するため、頑健でスループット性の高い神経細胞培養実験プロトコルで薬液投与プロトコルを最適化し、細胞密度と薬物効果の関係を精査したところ、
- ② グルタミン酸の作用を調べる実験の全データを統計的に解析し、撮影フィールドあたり細胞数の最適条件の検討を行った。
- ③ 免疫細胞化学染色像の画像処理アルゴリズムの改良 輝度分布解析法を確立した。実験プレート毎の対照実験群のドレブリンクラスターの輝度で、低、中、高の分類を行う。高輝度カテゴリーに分類されるドレブリンクラスターでグルタミン酸の効果が最も感度良く検出できることが分かった。

# 発達神経毒性試験への応用

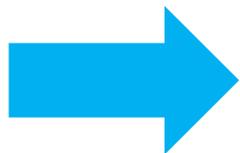
# なぜ発達神経毒性評価への応用が可能なのか。

## 神経細胞の発達における Drebrin の役割: 神経突起伸長とスパイン形成

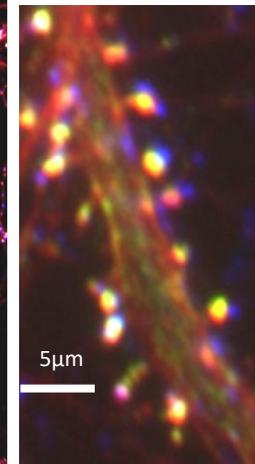
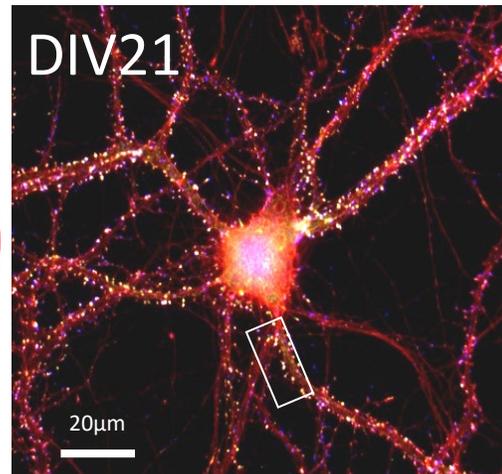
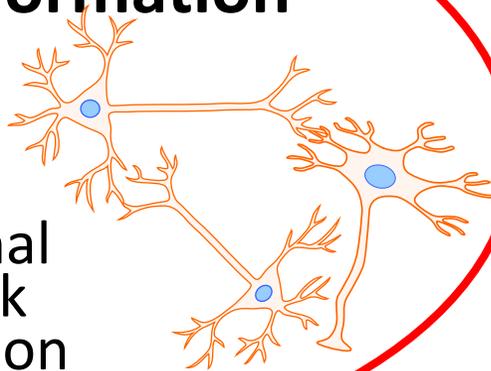


DIV10-21

**Synapse formation**



Neuronal network formation



In the spine **drebrin** and **actin** are highly concentrated. **Synapsin I** staining faces to them

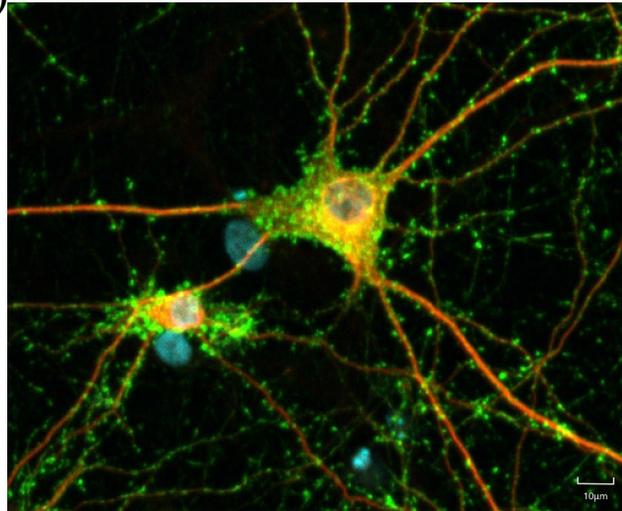
シナプスを形成している時期に化合物にばく露することで発達神経毒性を調べることができる。

# 合成カンナビノイドの発達毒性試験:

## 10 $\mu$ M CP55940のシナプス成熟期のばく露による神経細胞死と生存細胞

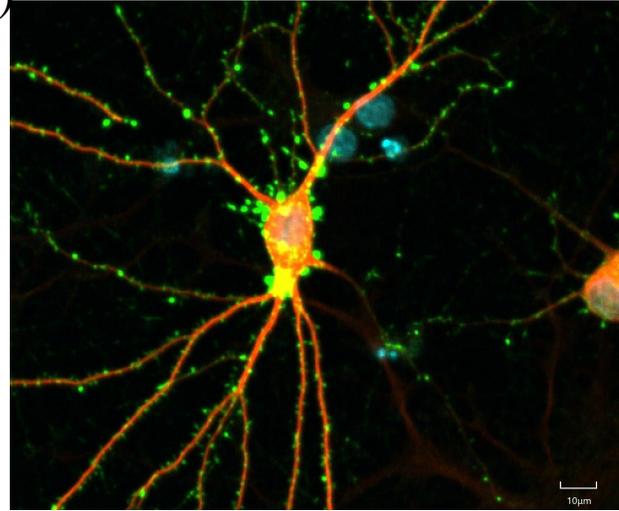
10  $\mu$ M CP55940で生存している神経細胞の Drebrin の異常集積

(A)



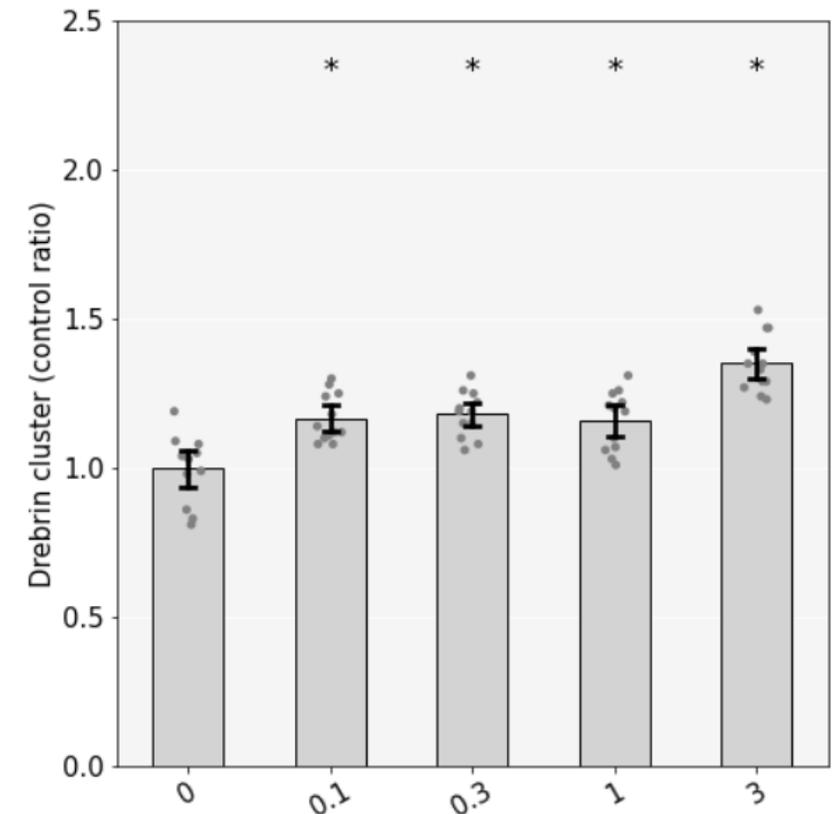
control

(B)



10  $\mu$ M CP55940

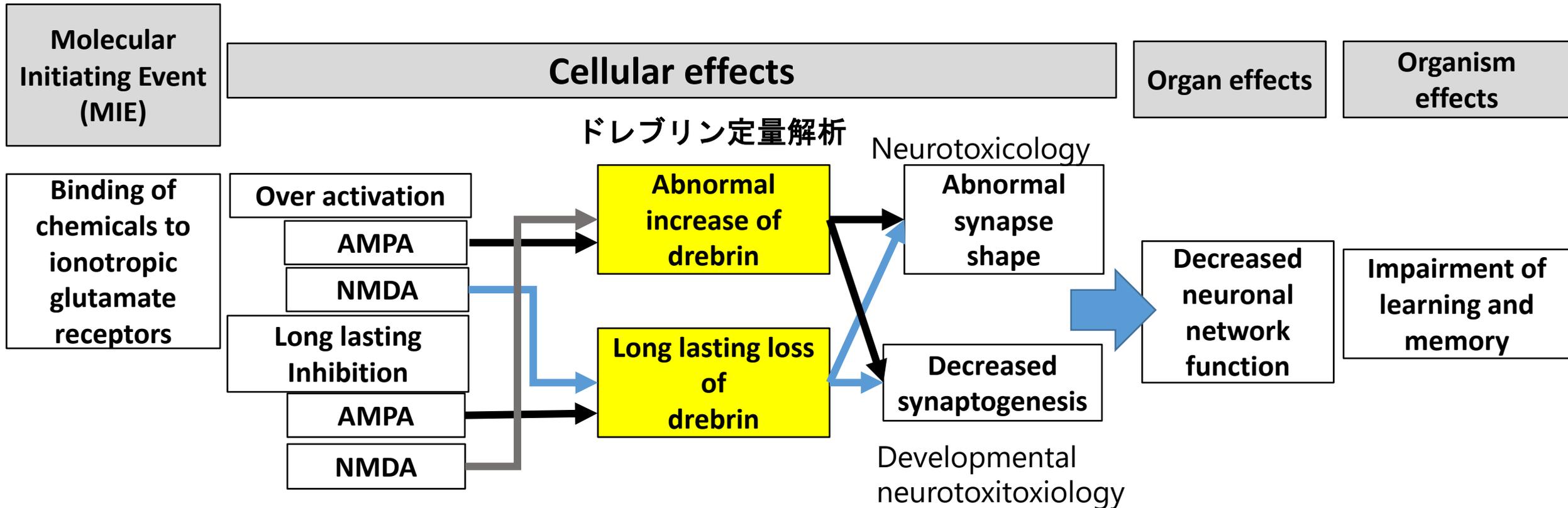
(C) 低濃度 (0.1~3  $\mu$ M) では Drebrin クラスタ数が増加した



- (A) controlのDIV21の代表的ニューロンと樹状突起スパインの Drebrin クラスタ  
(B) 10  $\mu$ M CP55940 を DIV7 に加えて DIV21 で観察した場合に生存していたニューロンと樹状突起スパインの Drebrin クラスタ

# 新規AOPの提案

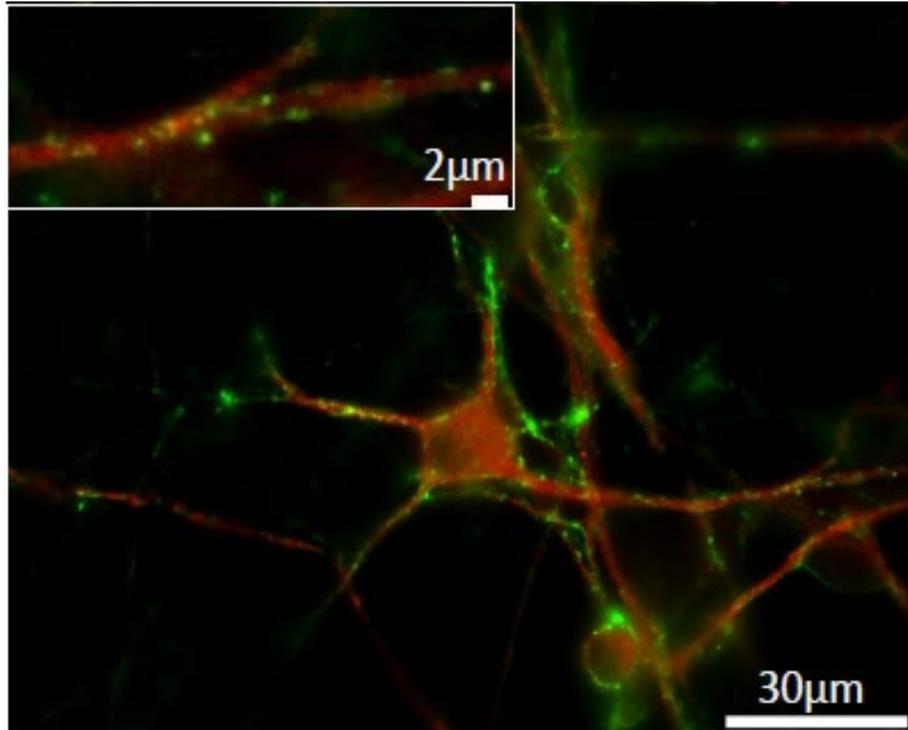
凍結海馬神経細胞を培養し、ドレブリンの樹状突起スパインへの集積をKEとして解析することで、ドレブリンクラスターの減少、または増加を評価する方法により、化合物の学習記憶への長期的な影響を評価することが可能である、



# iPS細胞由来神経細胞の利用に関する進捗状況: ドレブリンAの発現を確認

iPS由来神経細胞でのドレブリンの発現部位

培養初期ニューライトの先端部分に発現し、長期培養でスパインと思われる形態への集積も認められた。



Drebrin/MAP2 Unpublished data

ドレブリンの発現のないヒトiPS細胞由来神経細胞は、高濃度グルタミン酸での長時間処理による神経細胞死が見られない。それはNMDA受容体からのカルシウム流入の経路が未成熟であったからである。昨年、共同研究者の金村博士らが分化誘導に成功した神経細胞では、シナプス後部タンパクの発現の上昇が確認されていることから、このヒトiPS由来神経細胞を利用した毒性試験法の開発を計画する。

RESEARCH

Open Access

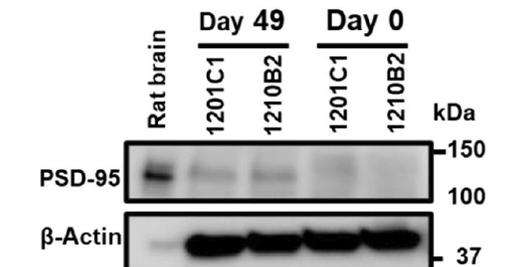
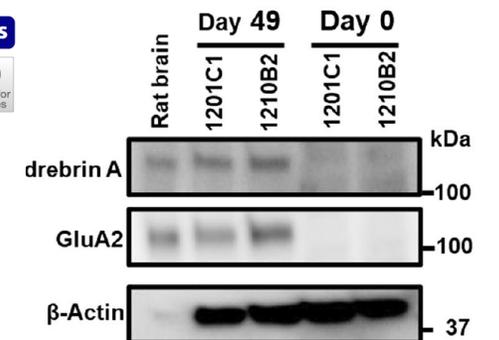


Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro

Kazuyuki Togo<sup>1,2</sup>, Hayato Fukusumi<sup>2</sup>, Tomoko Shofuda<sup>2</sup>, Hiroshi Ohnishi<sup>3</sup>, Hiroyuki Yamazaki<sup>4,5</sup>, Mariko Kato Hayashi<sup>6,7</sup>, Nana Kawasaki<sup>8</sup>, Nobuyuki Takei<sup>9</sup>, Takanobu Nakazawa<sup>10,11</sup>, Yumiko Saito<sup>12</sup>, Kousuke Baba<sup>1</sup>, Hitoshi Hashimoto<sup>10,13,14,15,16</sup>, Yuko Sekino<sup>17</sup>, Tomoaki Shirao<sup>4</sup>, Hideki Mochizuki<sup>1</sup> and Yonehiro Kanemura<sup>18,19\*</sup>

Togo et al. *Mol Brain* (2021) 14:149

<https://doi.org/10.1186/s13041-021-00851-1>



# 第10期の研究成果

- ① 神経細胞のドレブリンの量と局在を定量解析するため、最適な細胞密度を検証した。薬液投与プロトコルを最適化し、投与の時間差を克服した。
- ② 免疫細胞化学染色像の画像処理アルゴリズムの改良を行い、輝度分布解析法を確立した。低輝度、中間輝度、高輝度の3群に分けた解析を行った。
- ③ 画像の機械学習により、化合物の有害事象を予測するAIシステムの構築を行い、現在解析を実施している。
- ④ 神経細胞特異的アクチン結合タンパク質ドレブリンの消失をKey Event(KE)とする発達神経毒性や学習記憶障害を有害事象(AO)とする有害性発現経路(AOP)のOECDへの提案作業を開始して、本年度中の投稿を目指す。
- ⑤ ヒトiPS細胞由来神経細胞を利用した実験動物を利用しない実験系の構築に着手した。