

# 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 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授  
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

# 本日の話の流れ

- 研究課題の背景 現行の試験法の課題と本研究の目的
- シナプス機能不全による学習記憶障害(神経細胞死ではない)
  - 神経細胞の樹状突起スパインの機能
  - ドレブリンクラスタ数を自動測定するアルゴリズム開発
- 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の確立
- 脳内ドレブリン量と認知機能低下との因果関係
  - ドレブリンエクソダス現象の理解
- ラット胎仔由来初代培養神経細胞とヒトiPS細胞由来神経細胞との比較
  - 試験結果のヒト外挿性に関する考察

# 発達神経毒性・神経毒性を評価するインビトロ試験法開発の必要性

## 課題

- 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上、判断に熟練を要する。

## 世界的取り組み

- 動物実験を削減するために代替法を開発する。
- 化合物の毒性発現メカニズムを有害性帰結経路(Adverse Outcome Pathway; AOP)として整理する。

化学物質と生体内分子(タンパク質など)の最初の相互作用から動物個体の毒性発現にいたるToxicity Pathway(毒性経路)の解明と、これに沿った**一連のインビトロ試験**によって、実験動物に頼らない毒性試験法を確立する。

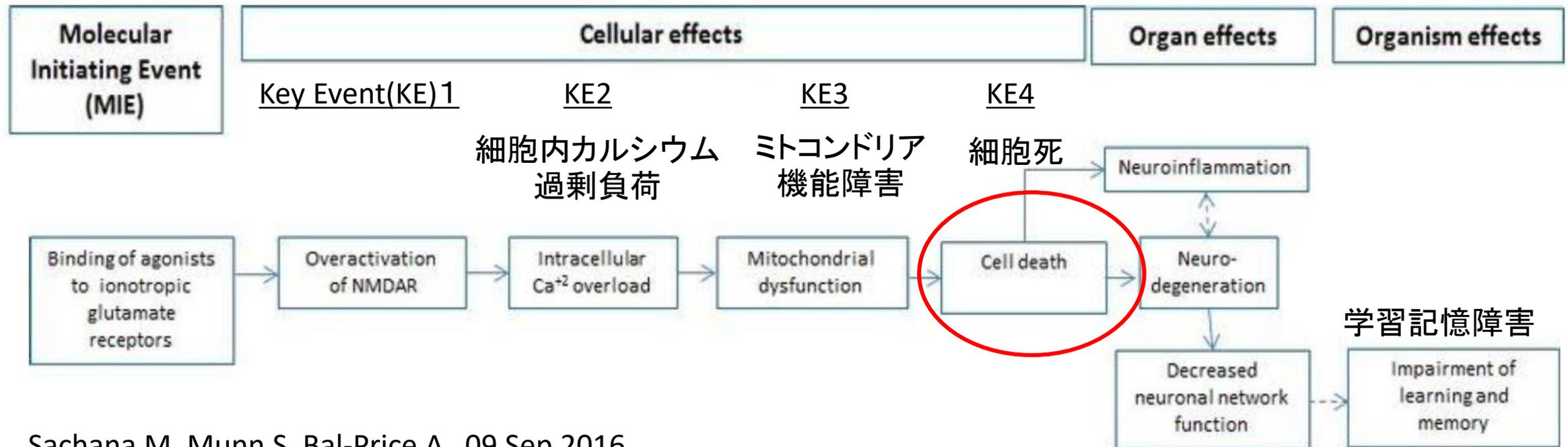
# 本研究の目的

1. 動物の個体に学習記憶障害をもたらす化合物の毒性を調べるために、近年提唱されているAdverse Outcome Pathway (AOP)の考え方に照らし合わせ、既存のAOP\_NO.48を参考にして、細胞レベルでの新たな事象を組み込んだより簡便なAOPを提案する。
2. グルタミン酸受容体への化学物質の結合を最初の分子相互作用(MIE)として、樹状突起スパインの形態変化をもたらすドレブリン消失を指標とする、培養神経細胞を使うハイスループット実験系を確立する。
  - 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を確立する。
  - 免疫細胞化学染色像の画像処理アルゴリズムを開発する。画像の機械学習により、化合物の有害事象を予測するAIシステムの構築を目指す。
  - ヒトiPS細胞由来神経細胞を利用した実験系の構築を目指す。

# 学習記憶障害をもたらす有害性発現経路(既存のAOPの1例)

AOP: Adverse Outcome Pathway

**【AOP No. 48】 Binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain causes excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment.**



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

# シナプス機能不全による学習記憶障害

# 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。

# 樹状突起スパインの発見

## 樹状突起スパインの発見

形の変化が軸索との接触の変化となり、脳の状態を反映したり、学習機能と関与すると推察

ニューロン説：神経終末は不連続。

His (1886), Forse(1887), Ramon y Cajal(1888)

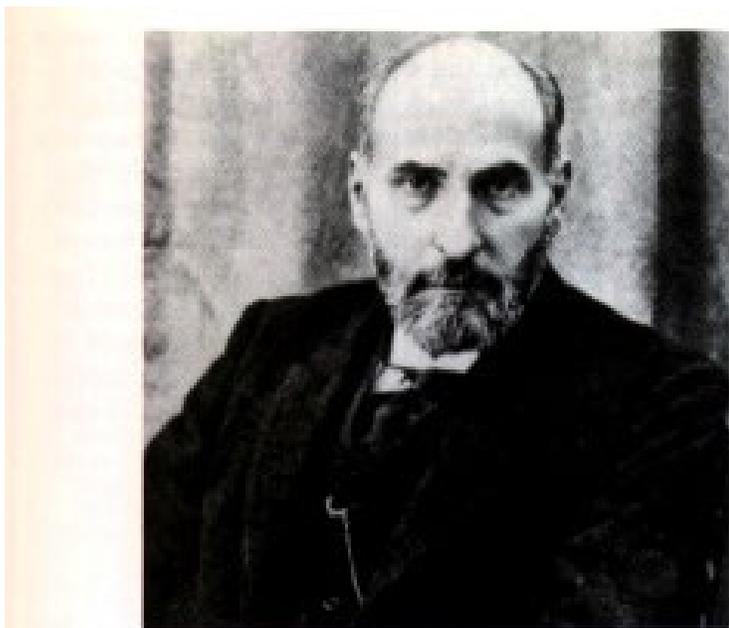
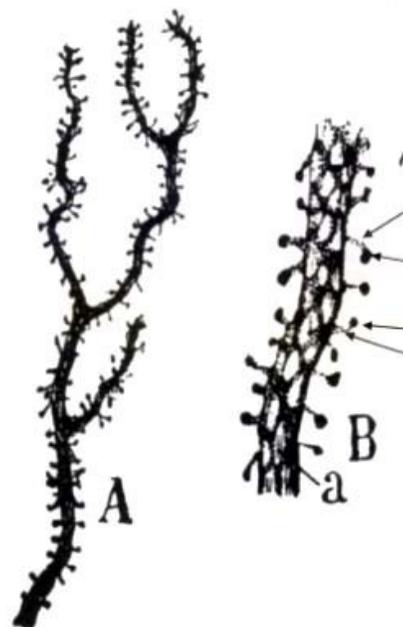


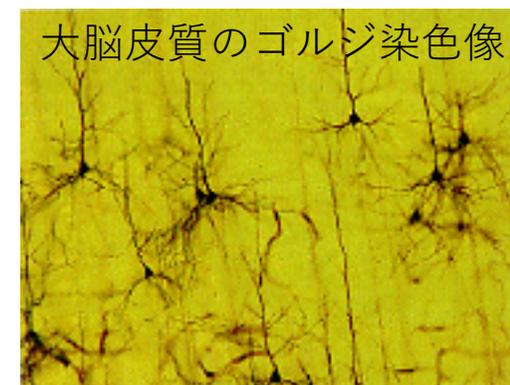
Figure 3.20. Santiago Ramón y Cajal (1852–1934), winner of the 1906 Nobel Prize for his extensive contributions to neuroanatomy.



カハールによる  
樹状突起スパインのスケッチ

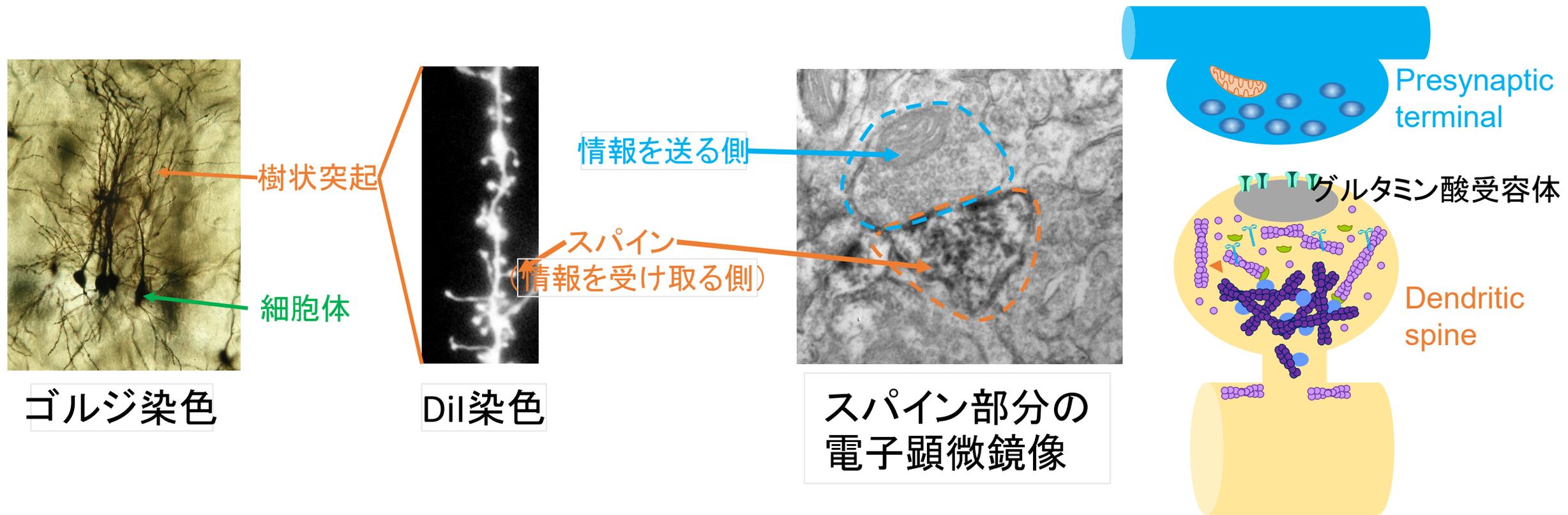


海馬のゴルジ染色像

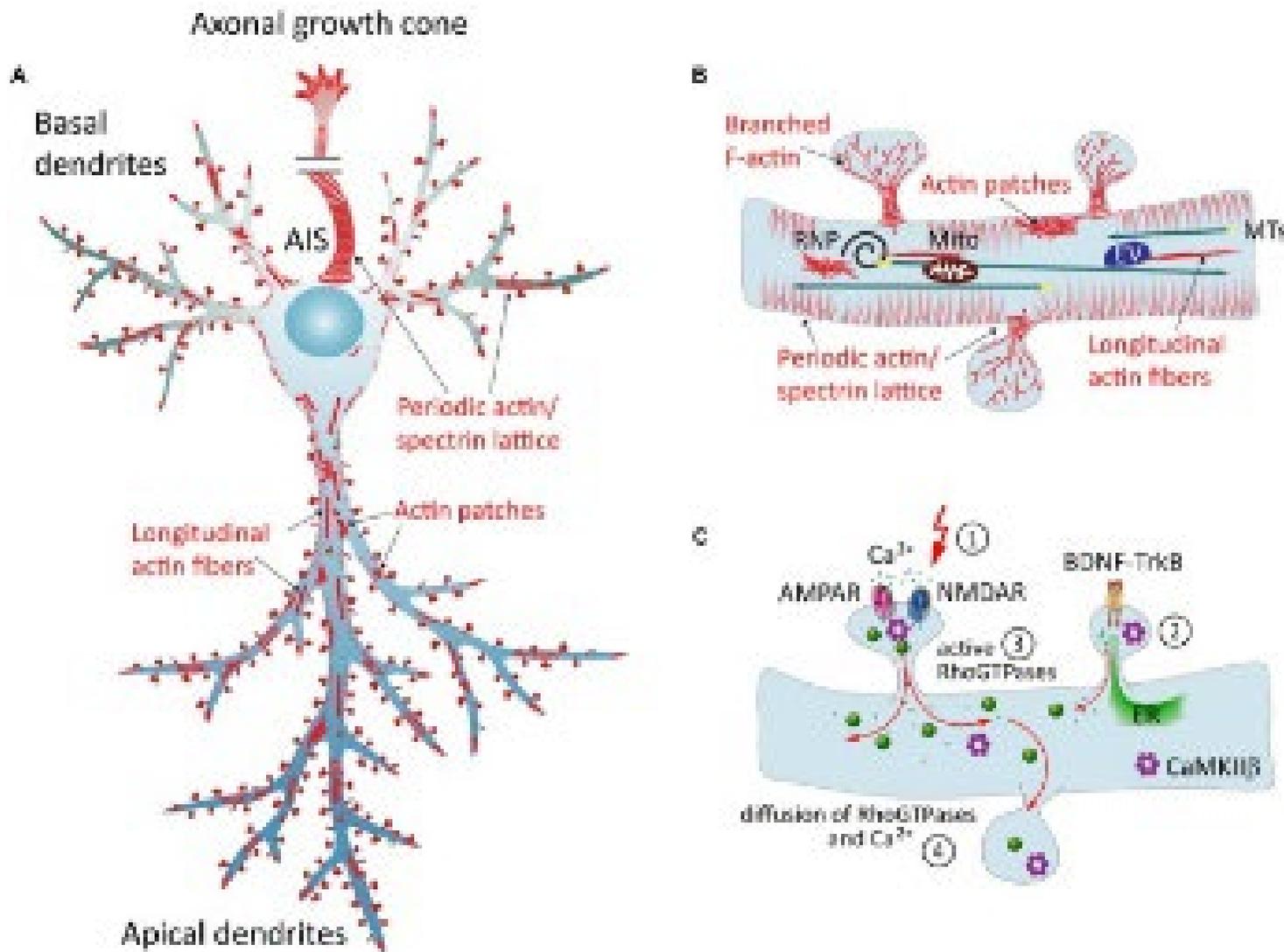


大脳皮質のゴルジ染色像

# 樹状突起スパインには興奮情報を伝えるシナプスが形成される



# 樹状突起スパインはアクチンリッチな構造である。



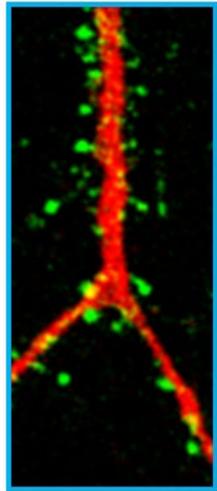
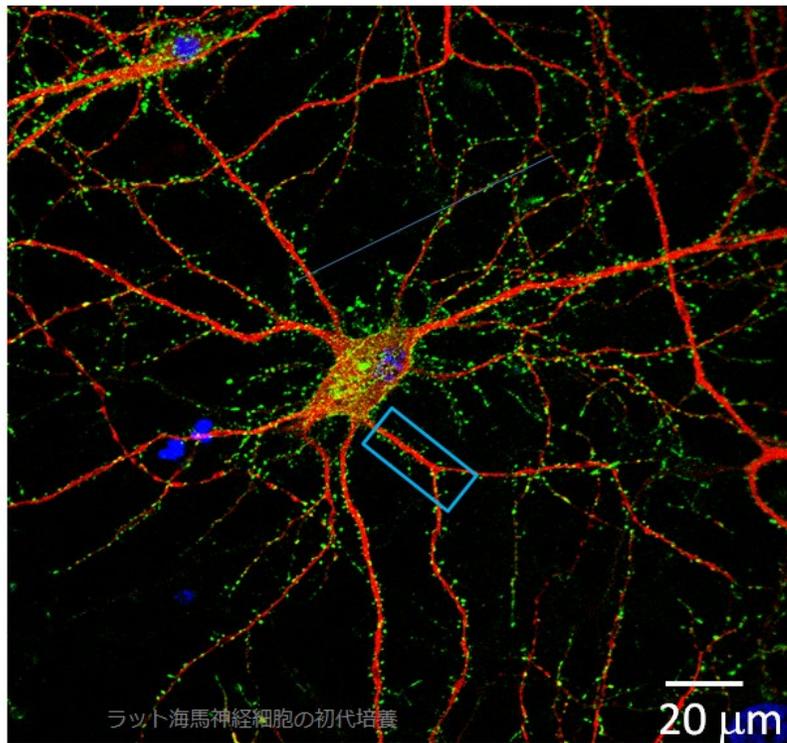
Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations

Anja Konietzny, Julia Bär, and Marina Mikhaylova\*

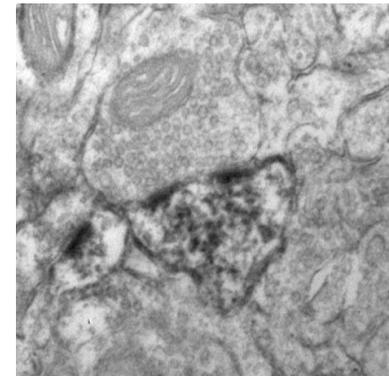
Front Cell Neurosci. 2017; 11: 147.  
Published online 2017 May 18. doi:  
10.3389/fncel.2017.00147

# 樹状突起スパインのアクチン結合タンパク質ドレブリン

ドレブリンは、成熟した神経細胞の樹状突起スパインのアクチンに結合して樹状突起スパインの形成と可塑性を担うアクチン結合タンパク質である。



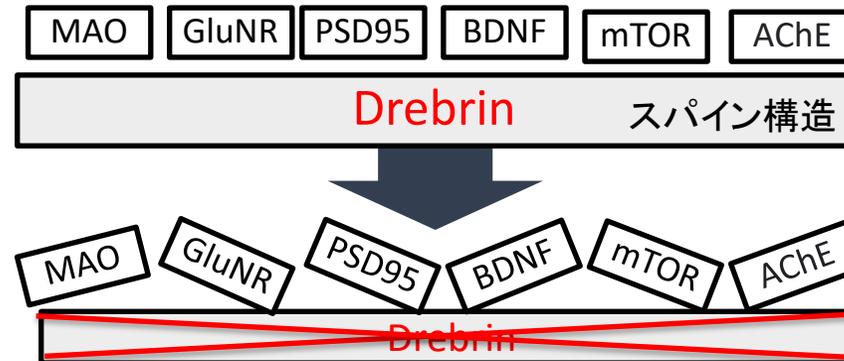
Drebrin  
MAP2  
Hoechst



ドレブリン抗体を使った免疫電子顕微鏡像(白尾博士提供)

ドレブリンアクチン細胞骨格がスパインからなくなると、樹状突起スパインの構造が不安定となる。

シナプス後部

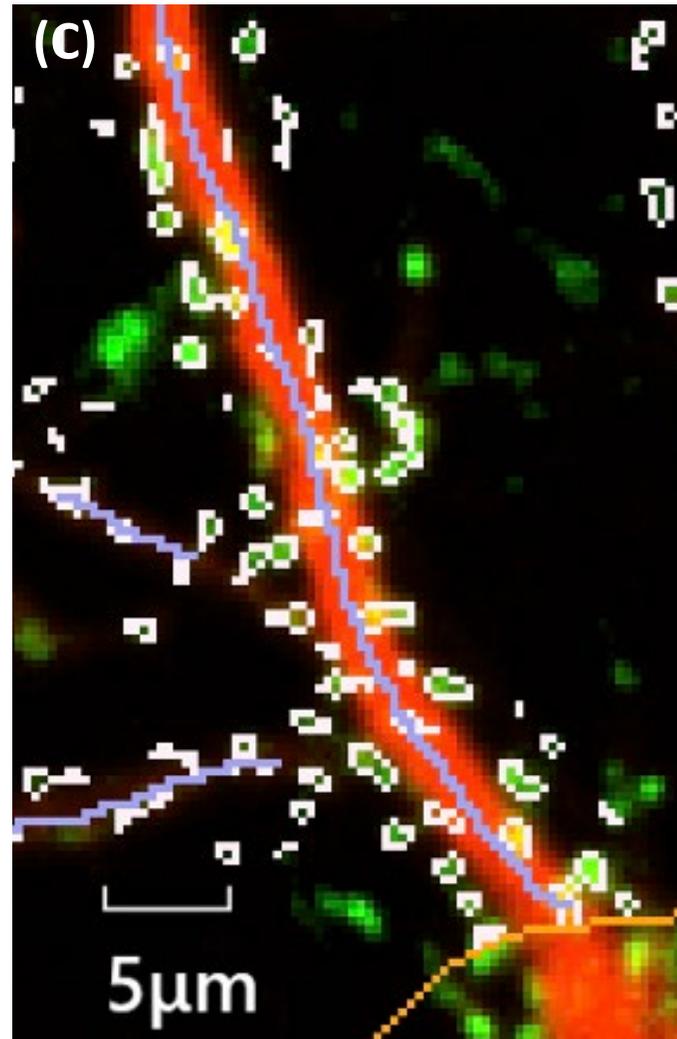
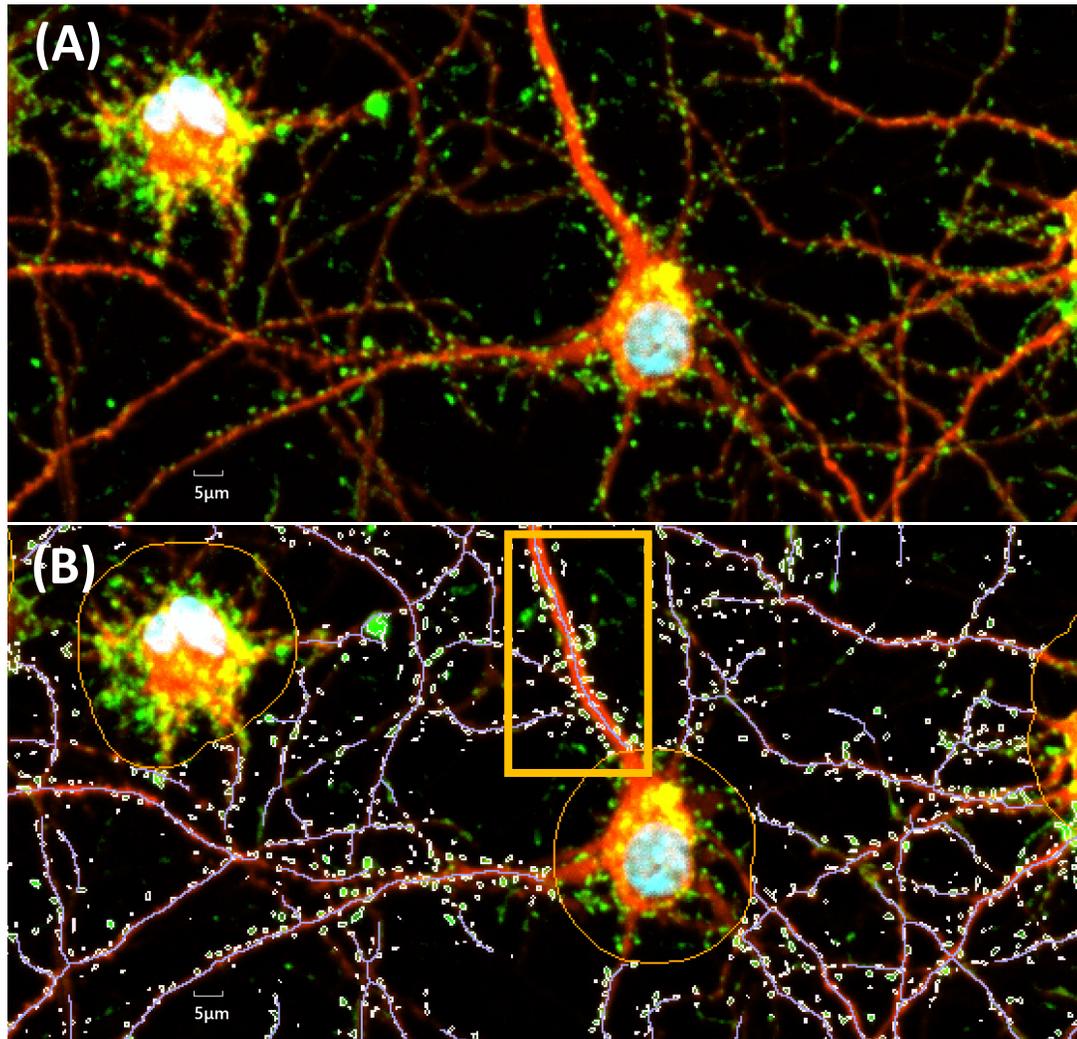


シナプス機能  
タンパク質群

成熟した培養神経細胞(ラット)のドレブリンの分布:  
緑色の構造が、樹状突起スパイン(シナプス後部構造)  
に集積するドレブリンの免疫細胞化学染色像  
(白尾博士提供)

# ドレブリンクラスタ数の定量的解析

## イメージサイトメータによるドレブリンクラスタの自動認識

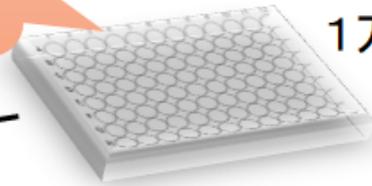


- (A) Fluorescent images of cultured rat hippocampal neurons
  - (B) Analysis result
  - (C) the yellow boxed regions in (B)
- Skeleton of dendrites (purple lines)  
Drebrin cluster (white circles)

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を確立する。

# 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⇒データ再現性にかかわる要素のチェック

平面性の高いCOPプレート(2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

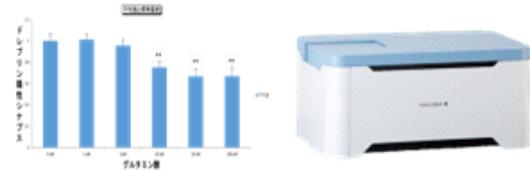
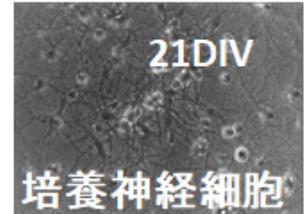
解剖技術に左右されないサンプルで、ロットごとに品質チェックされた。



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。

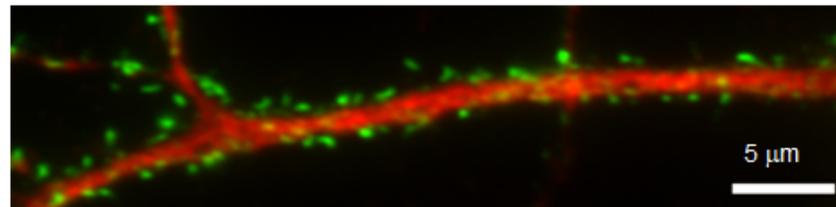


ハイコンテンツアナリシス

画像取得・解析の完全自動化により、再現性が向上する

免疫染色  
(drebrin, MAP2, DAPI)

薬物投与法改善



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。

# 凍結神経細胞の播種方法の論文(プロトコルビデオ付き論文)

**jove** Search... Faculty Resource Center Research Education

JoVE Journal > Neuroscience

Abstract Introduction Protocol Results Discussion Materials Acknowledgements References Automatic Translation

**Neuroscience**

## Easy and Reproducible Low-Density Primary Culture using Frozen Stock of Embryonic Hippocampal Neurons

Published: January 27, 2023 doi: [10.3791/64872](https://doi.org/10.3791/64872)

Noriko Koganezawa<sup>1</sup>, Reiko T. Roppongi<sup>2</sup>, Yuko Sekino<sup>3,4</sup>, Izuo Tsutsui<sup>3</sup>, Ayaka Higa<sup>5</sup>, Tomoaki Shirao<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, **Gunma University**, <sup>2</sup>Gunma University Initiative for Advanced Research, **Gunma University**, <sup>3</sup>Department of Veterinary Pathophysiology and Animal Health, Graduate school of Agricultural and Life Sciences, **The University of Tokyo**, <sup>4</sup>Institute for Drug Discovery Innovation, <sup>5</sup>AlzMed, Inc.

### Summary

A ready-to-use frozen stock of neurons is a powerful tool for evaluating synaptic functions. Here, we introduce an easy low-density primary culture from frozen stock using a 96-well plate.

J Vis Exp. 2023 Jan 27;(191).  
doi:10.3791/64872

PubMedで  
検索！！

Sekino  
Higa

無料で見ることができます。

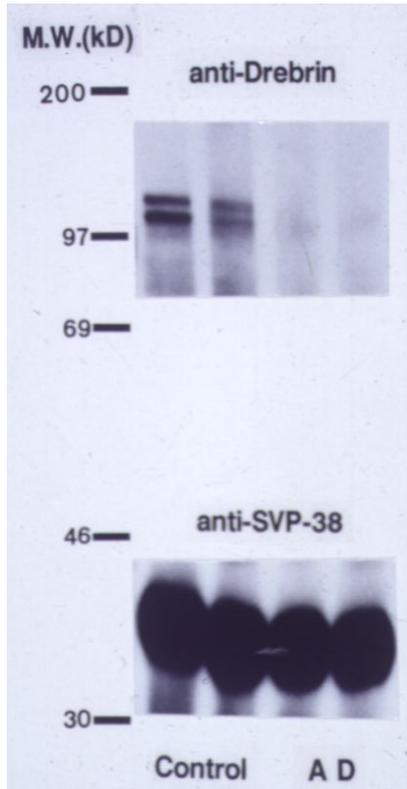
撮影場所：  
東京大学アントレプレナーラボ355室  
アルメッド株式会社

シナプス機能不全は培養神経細胞を使ったドレブ  
リンクラスター数解析で評価できる。

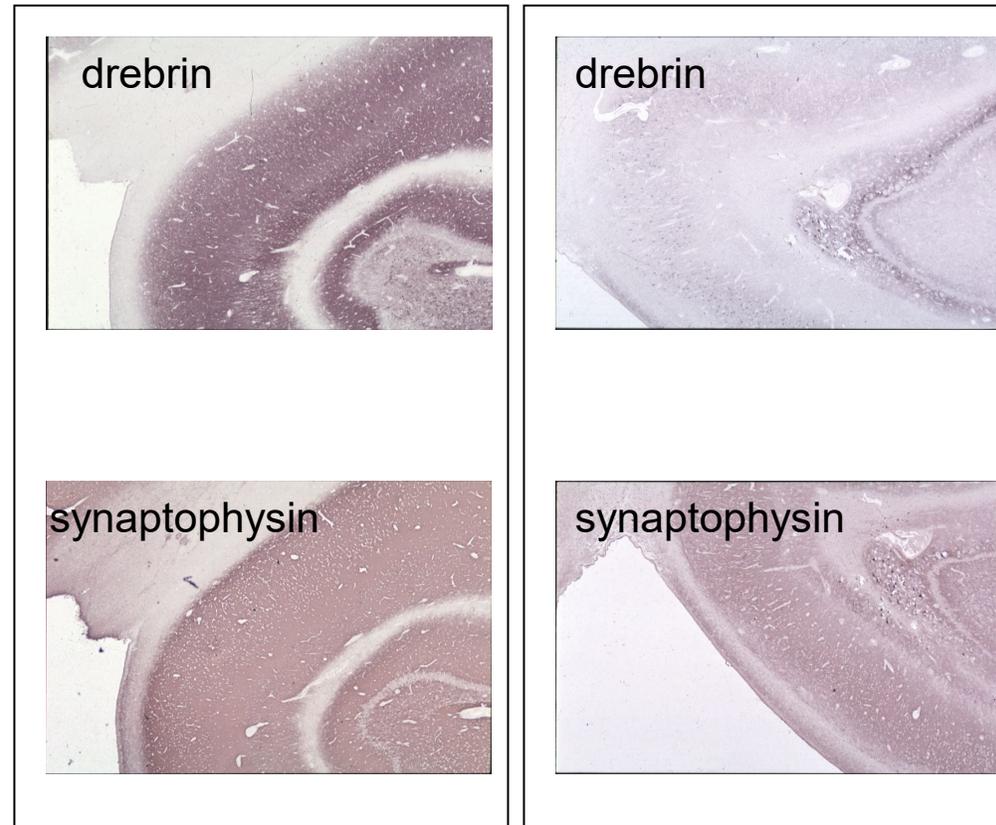
# アルツハイマー病のシナプス機能不全とドレブリンの減少

Harigaya et al., *J Neurosci Res* (1996)

Western Blotting



Immunohistochemistry of Hippocampus



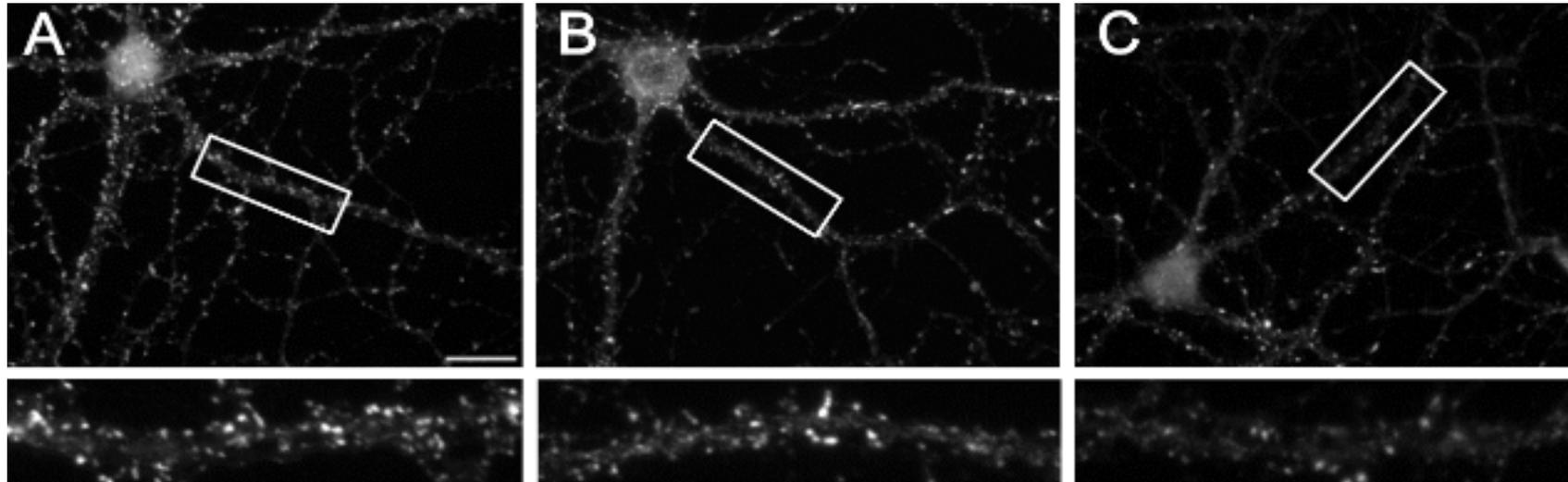
Aged control

AD

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などでドレブリンの減少を調べることが、時間とコストの節約になる。

# アミロイドβによるドレブリンの減少

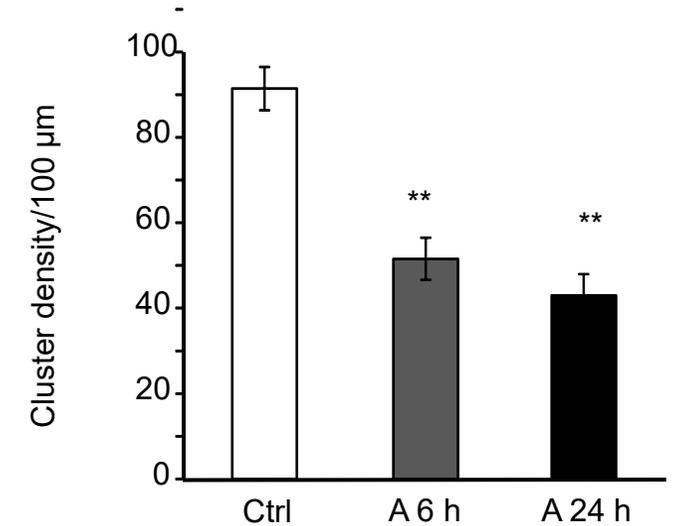
## 薬理的アルツハイマー病病態モデル細胞



コントロール

投与6時間後

投与24時間後



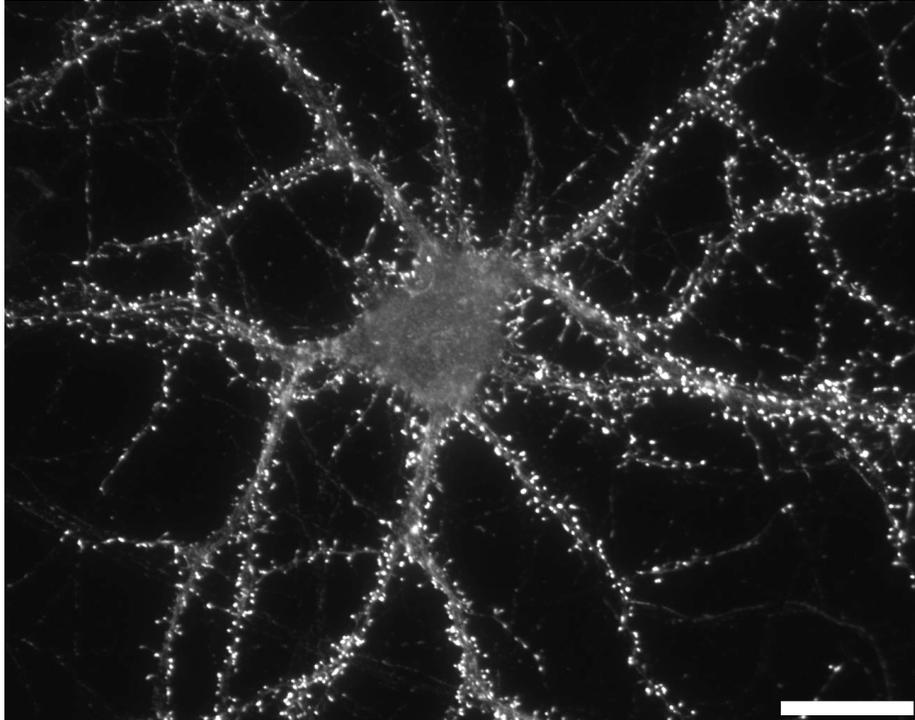
(Ishizuka et al. 2014)

- 樹状突起スパイン数は変化しないがドレブリンクラスター数が減った。
- スパイン数が減らなくても、スパインが細くなり、シナプス機能不全が起こることが分かった。

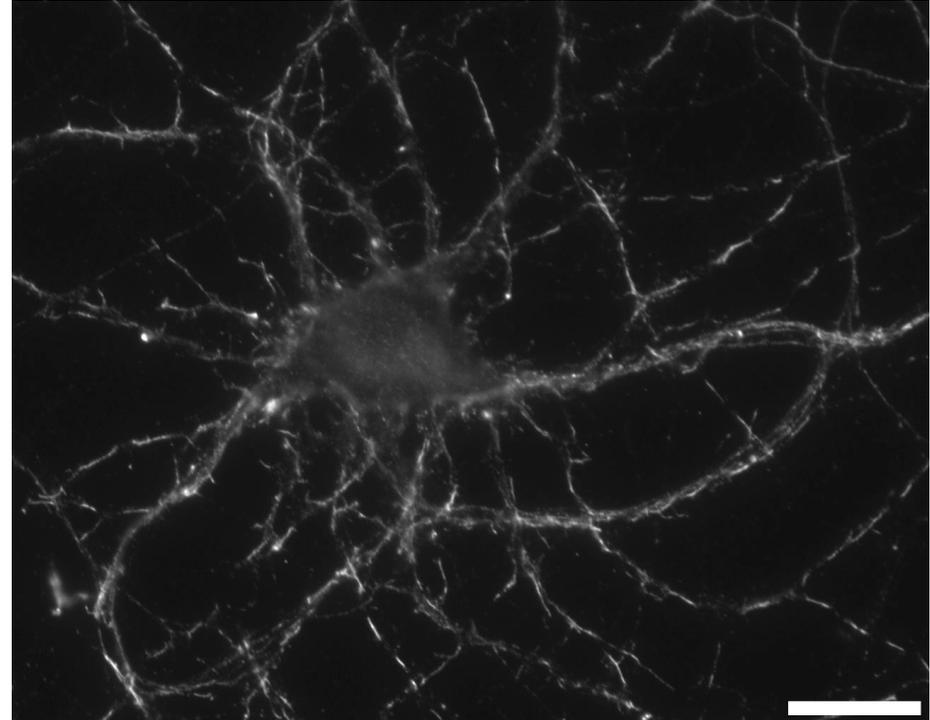
# 神経毒性試験への応用

# グルタミン酸投与によるシナプス毒性とドレブリンクラスタ消失

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

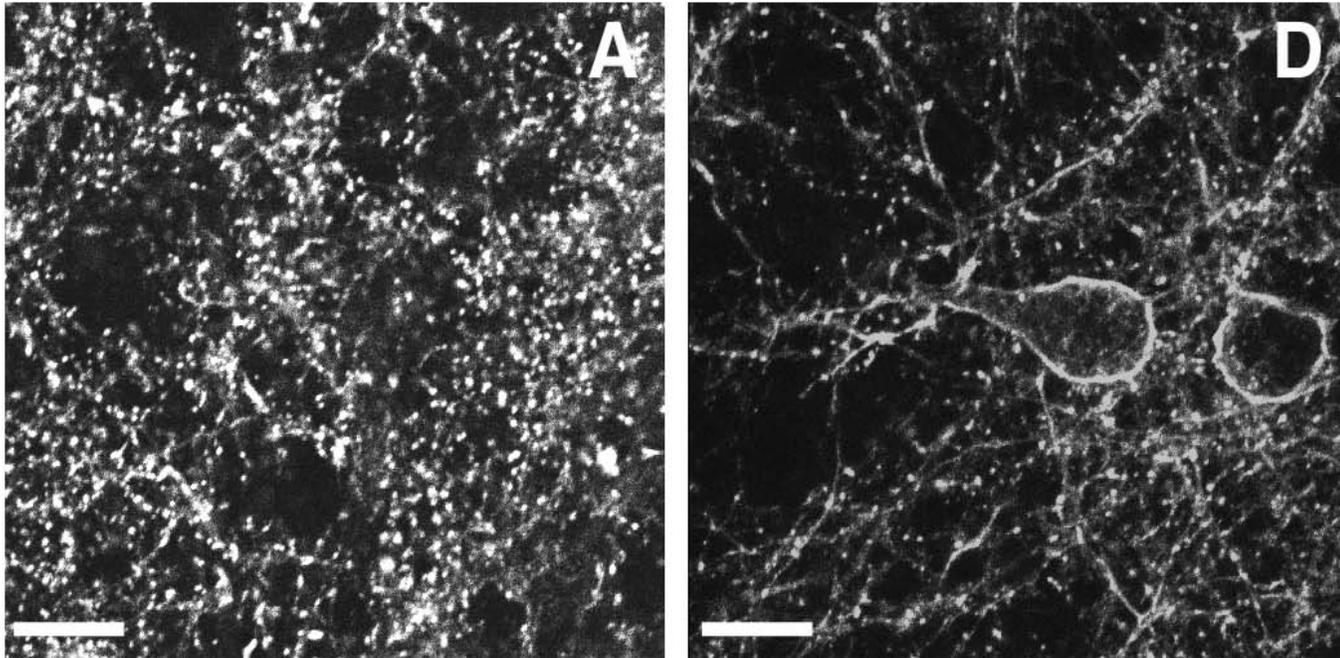


ラット海馬培養神経細胞のドレブリン分布:NMDA受容体刺激による局在変化

A; 樹状突起スパインにドレブリンが局在しているので、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。

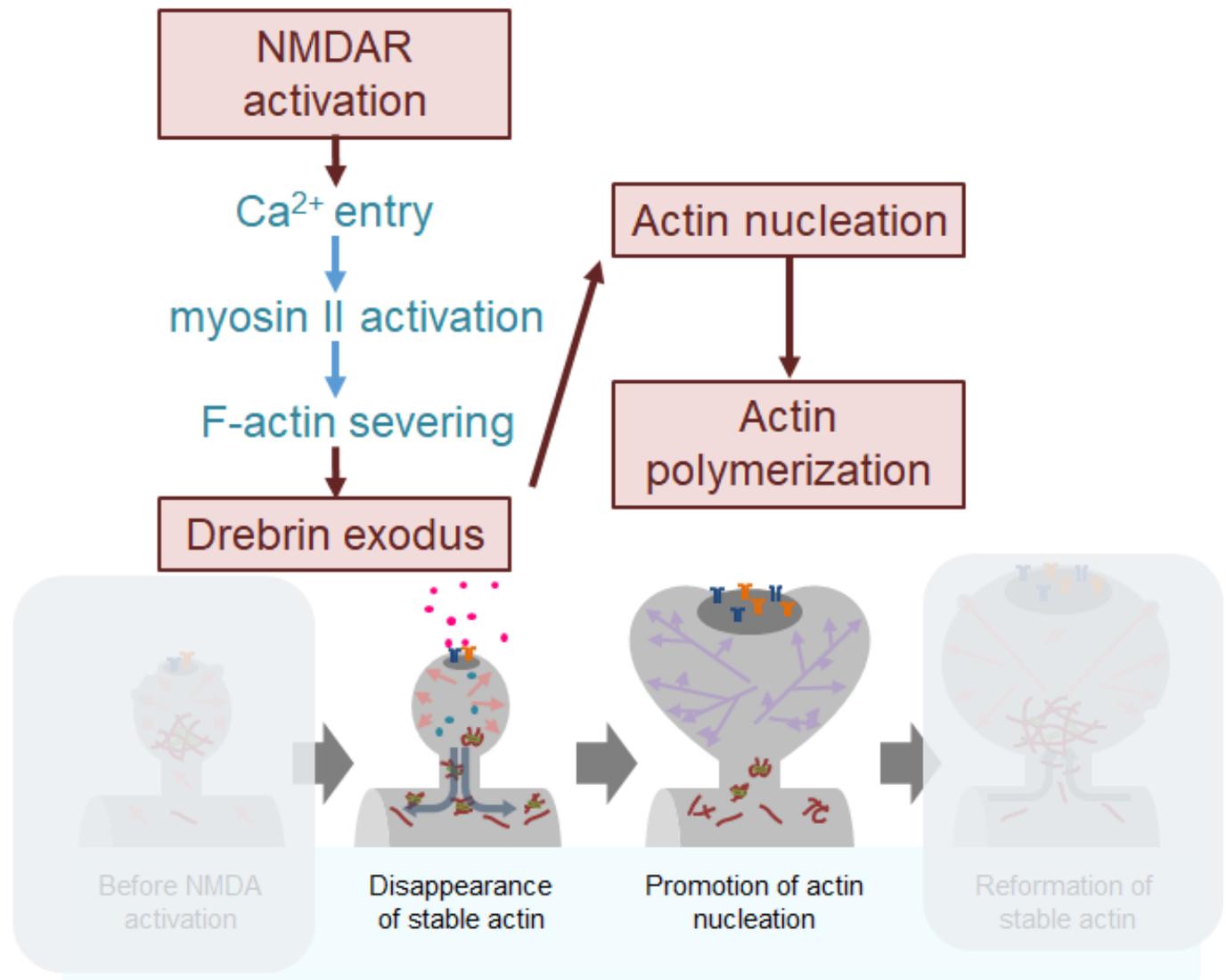
B. グルタミン酸を投与すると、ドレブリンがスパインから樹状突起の幹の方に移動する。ドレブリンクラスタ数の減少として定量的に評価できる。

# ドレブリンエクソダス発見(関野ら)



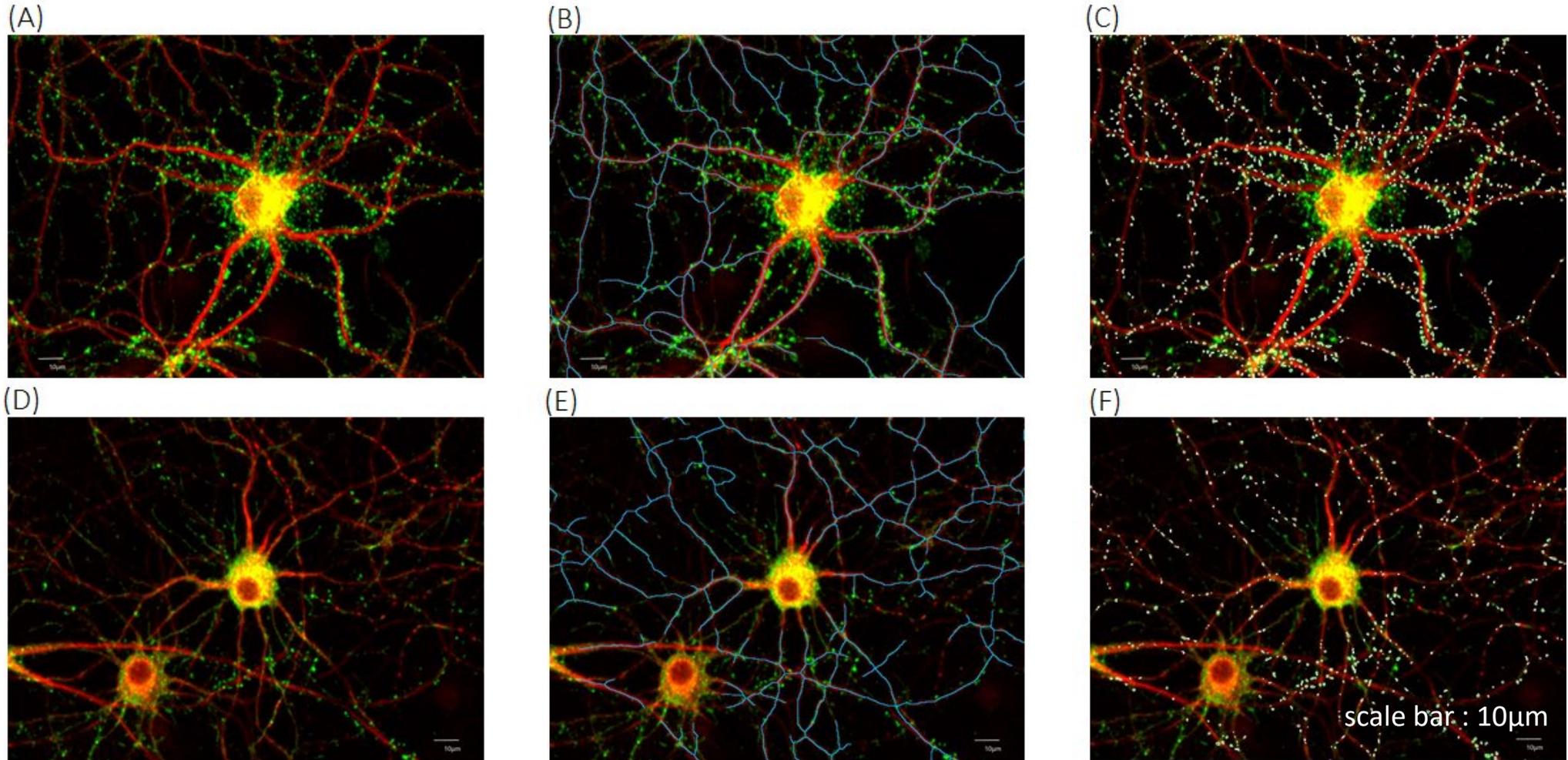
- ラット大脳皮質初代培養細胞
- グルタミン酸処理により、ドレブリンクラスターが消え、細胞体周辺部や樹状突起が見えるようになる。

# ドレブリンエクソダスのシナプス可塑性における役割



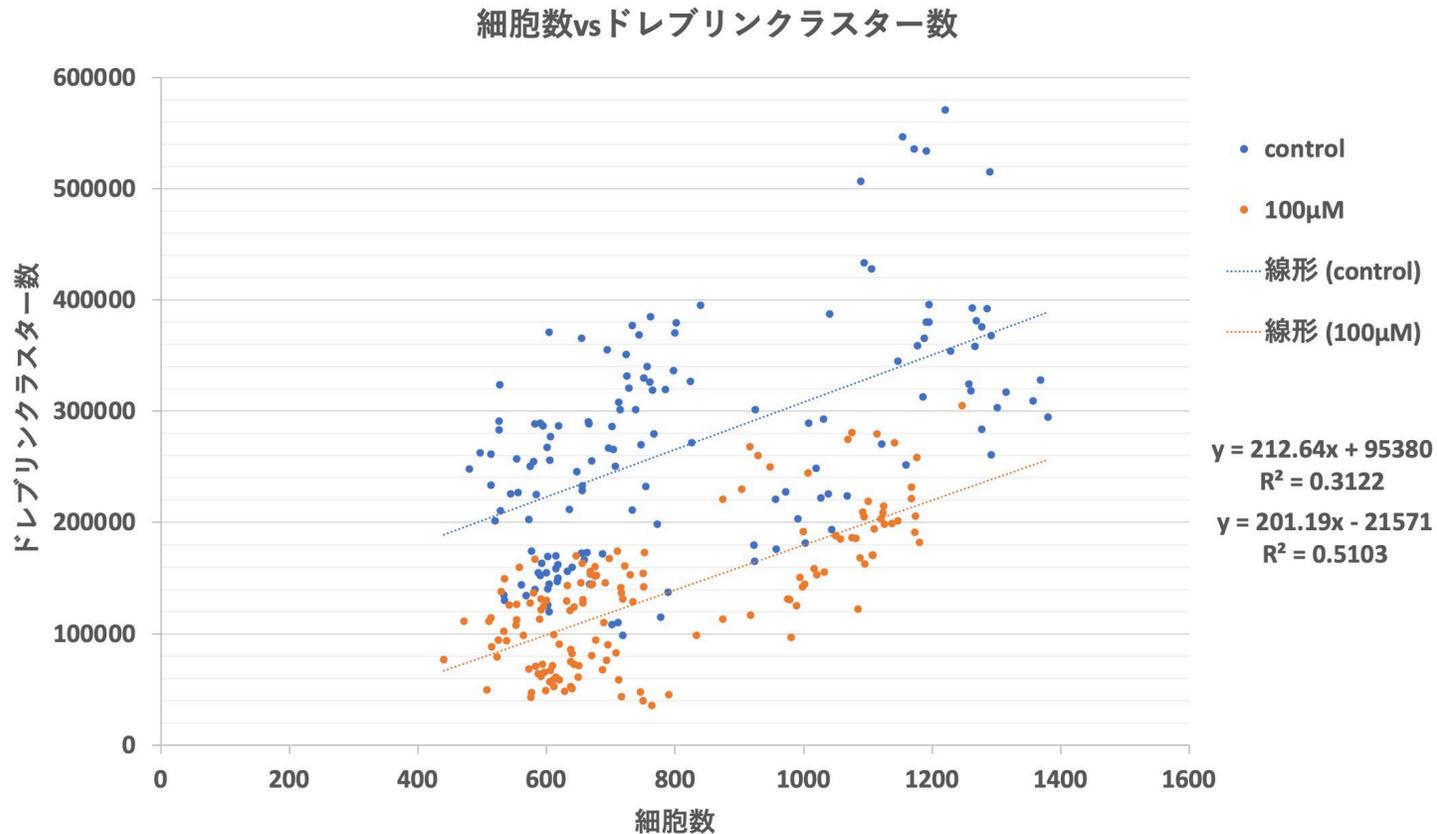
	dynamic actin (F-actin 36)		NMDAR
	stable actin (F-actin 40)		AMPA
	elongating actin (F-actin 36)		Glutamate
	myosin fiber		Ca <sup>2+</sup>

# 共焦点イメージサイトメーターでの撮影像と、 CellPathFinderアルゴリズムによるドレブリンクラスターの自動認識



(A - D) Fluorescence images of drebrin (green), MAP2 (red) and DAPI (blue) in cultured hippocampal neurons. (A-C: control, D-F: 100 µM glutamate)  
(B and E) Dendritic skeletons (blue lines) mapped on fluorescence images. (B: control, E: 100 µM glutamate)  
(C and F) Drebrin clusters (white areas) mapped on fluorescence images. (C: control, F: 100 µM glutamate) **(Unpublished data)**

# 撮像視野の神経細胞数とドレブリンクラスタ数との相関関係



細胞密度が高くなると混在するグリア細胞増加がみられることから神経細胞への直接作用が弱く評価される可能性を示している。

解析プレート総数: 27

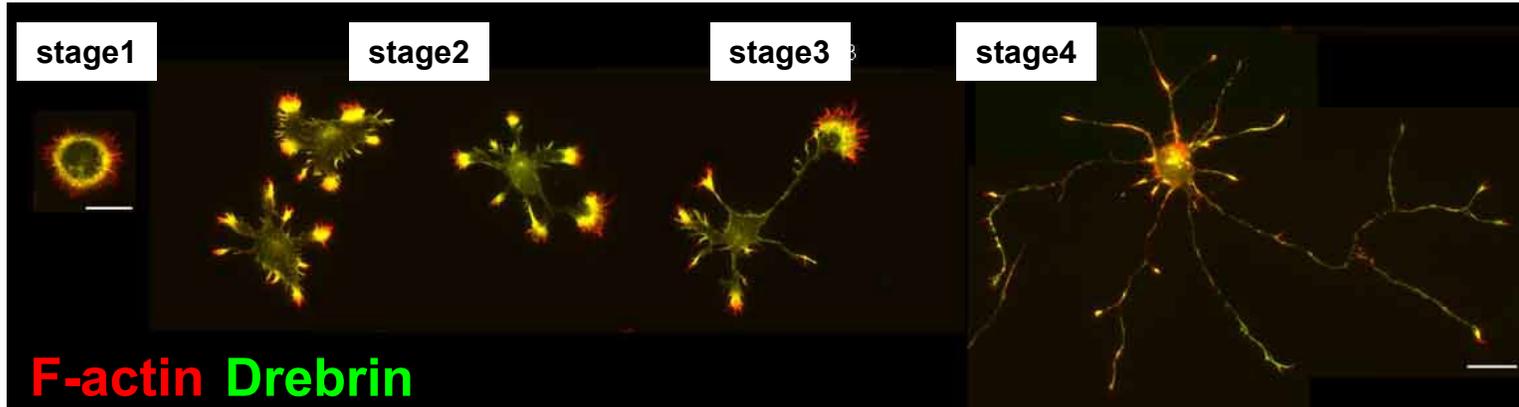
- Control 溶媒処理群: 143 wells
- 100 $\mu$ M グルタミン酸投与群 : 144 wells

# 発達神経毒性試験への応用

# 樹状突起スパインの形成過程は培養神経細胞で再現できる



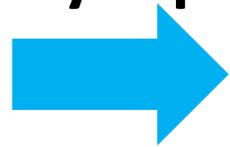
Neural Stem Cell



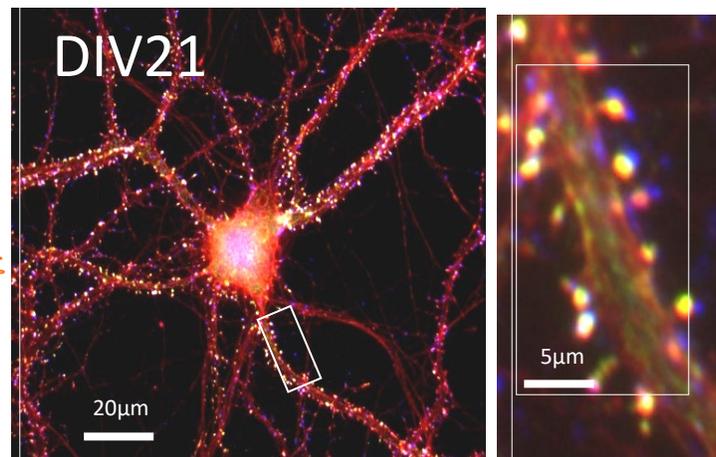
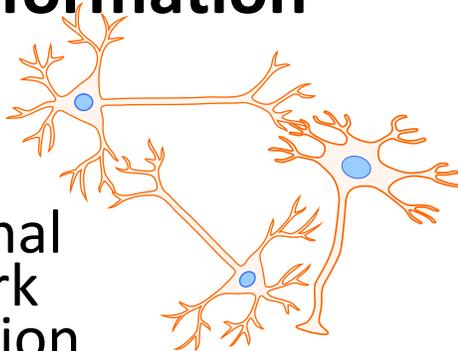
DIV10-21のシナプス形成期に化合物処理することにより発達神経毒性試験の代替法を作ることができる。

DIV10-21

Synapse formation



Neuronal network formation



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

ラット海馬初代培養神経細胞とヒトiPS細胞由来神経細胞：  
ドレブリンAの発現、スパイン局在、グルタミン酸によるドレブリンエクソダス

# iPS細胞由来神経細胞の成熟化へとりくみ

「再生医療実現拠点ネットワークプログラム(疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム)」2020年採択

## 2.5次元共培養系を用いたヒト神経細胞シナプス成熟法の開発



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構  
Japan Agency for Medical Research and Development

成果情報

脳型ドレブリンを指標としたヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟評価法の開発とシナプス形成過程の解明

掲載日 令和3年11月4日

国立病院機構大阪医療センター・臨床研究センター・先進医療研究開発部(金村米博、福角勇人)、大阪大学大学院医学系研究科神経内科学(東郷一行、望月秀樹)、群馬大学(白尾智明)、東京大学大学院薬学系研究科(関野祐子)らの研究グループは共同で、脳型ドレブリン※1を指標としたシナプス成熟評価法を開発し、ヒトiPS細胞から分化誘導して作製したヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟過程の詳細な解析とその成熟度評価を行い、その特徴を明らかにしました。また、多施設間バリデーション試験を実施し、頑健性を有するヒトiPS細胞由来神経細胞の分化誘導法の開発に成功しました。本研究成果は、2021年10月11日付で国際科学誌『Molecular Brain』に掲載されました。

1. 脳型ドレブリンを指標としたヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟評価法の開発
2. ドレブリンA発現を指標としたヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス形成過程の詳細解析とその特徴の解明
3. 頑健性を有するヒトiPS細胞由来神経細胞の分化誘導法の開発

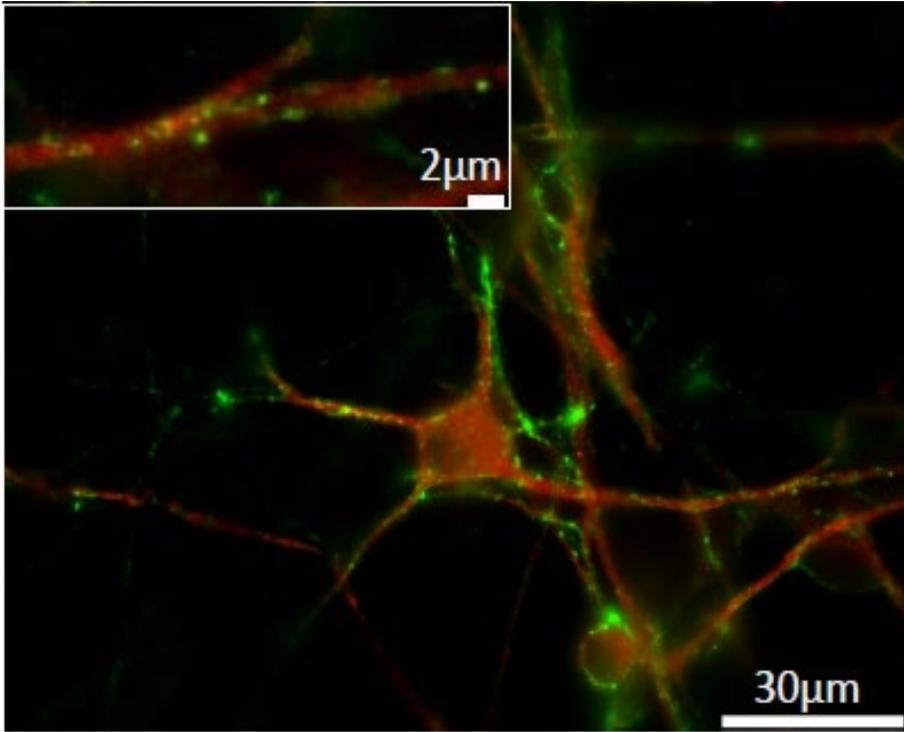
ヒトiPS細胞由来細胞を医薬品の安全性薬理試験での利用のために満たすべき条件

- 安定した品質の神経細胞の大量供給が可能である。
- ヒト有害反応が予測のための適切なマーカーと薬理実験法が整備されていること。
- 多施設により分化誘導法の頑健性のバリデーションが行われていること

# 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

RESEARCH

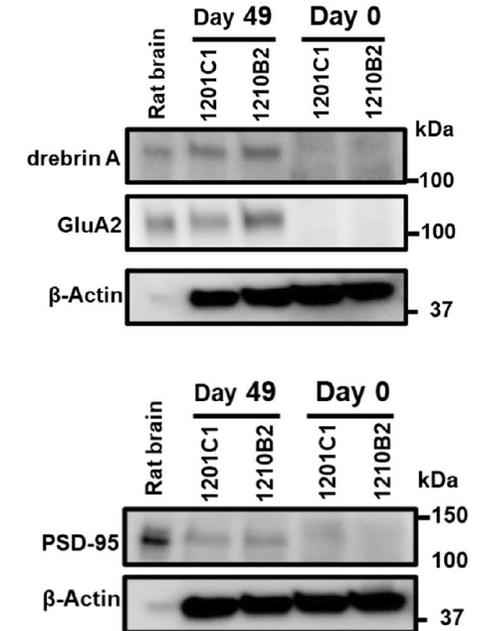
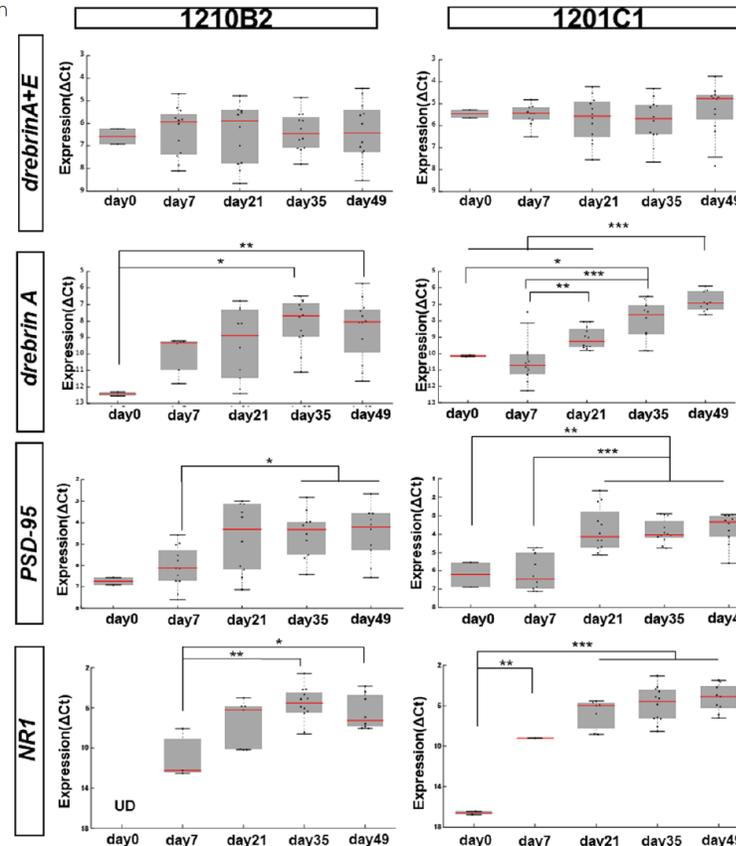
Open Access



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 Yon

シナプス後部タンパクの発現の上昇が確認されている。



Togo et al. Mol Brain (2021) 14:149  
<https://doi.org/10.1186/s13041-021-00851-1>

iScience

 CellPress  
OPEN ACCESS

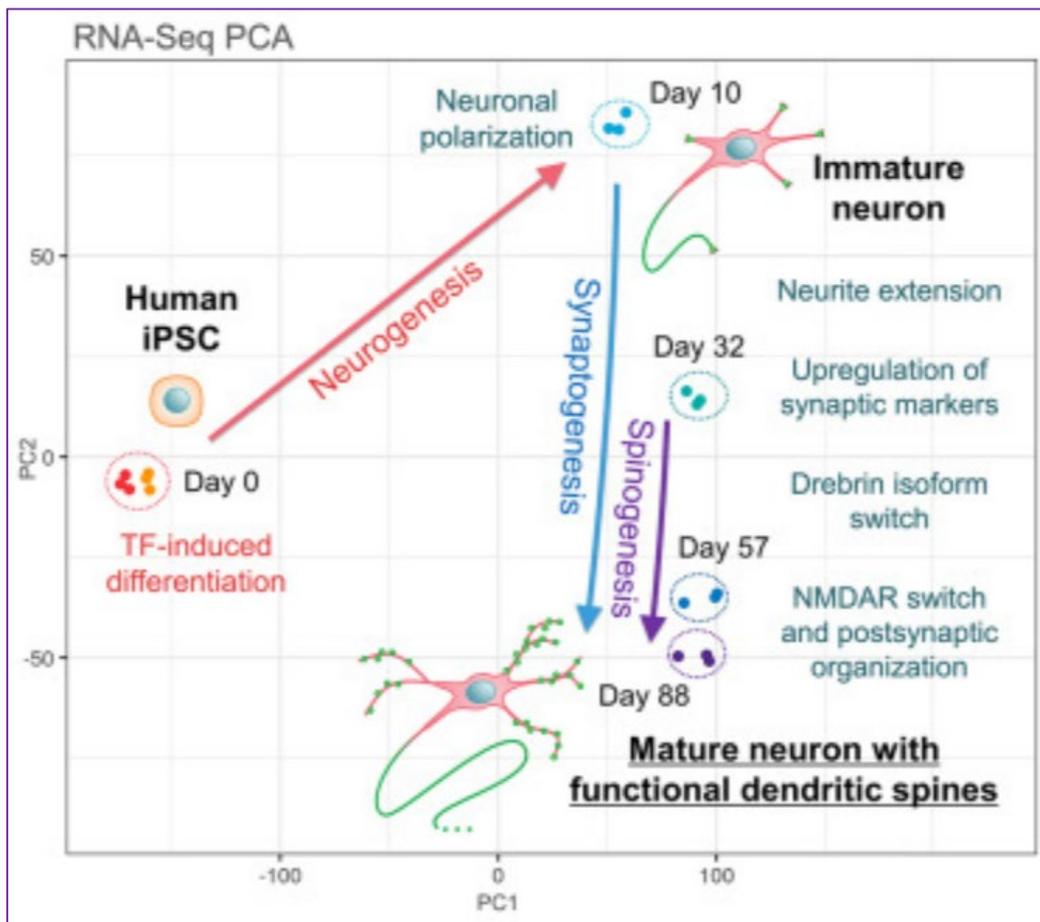
## Article

# Dendritic spine formation and synapse maturation in transcription factor-induced human iPSC-derived neurons

Waka Lin,<sup>1,4,\*</sup> Shusaku Shiimoto,<sup>1</sup> Saki Yamada,<sup>1</sup> Hikaru Watanabe,<sup>1</sup> Yudai Kawashima,<sup>1</sup> Yuichi Eguchi,<sup>1</sup> Koichi Muramatsu,<sup>1</sup> and Yuko Sekino<sup>2,3</sup>

ARTICLE | [VOLUME 26, ISSUE 4, 106285, APRIL 21, 2023](#)

## Graphical abstract

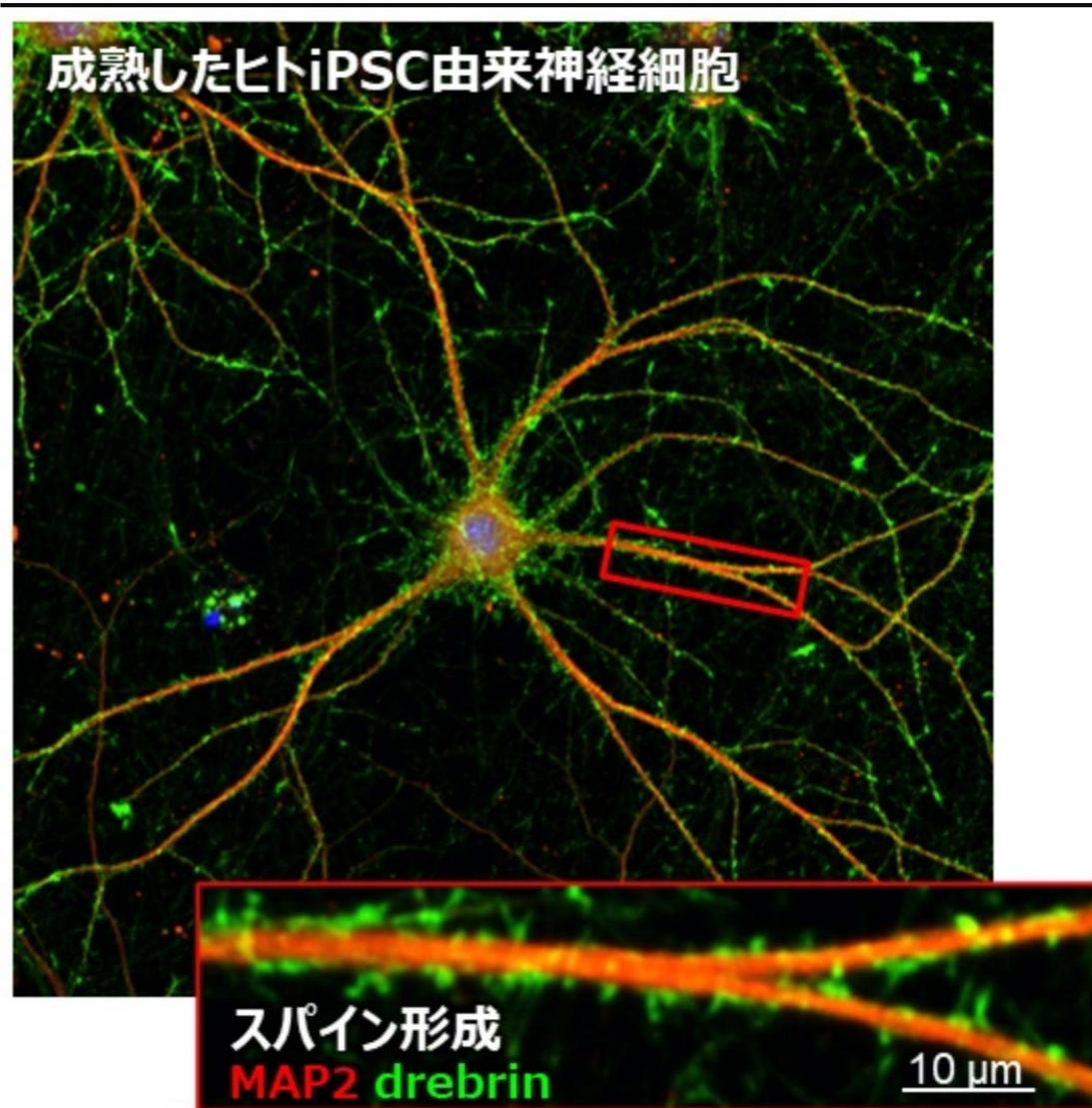


## Highlights

- Synaptic maturation and spinogenesis of cultured human iPSC-derived neurons
- TF-induced iPSC neurons reproduce postnatal brain development features
- Robust dendritic spine formation is shown by drebrin A expression and localization
- TF-induced iPSC neurons acquire mature functions underlying synaptic plasticity

# 発表論文の概要

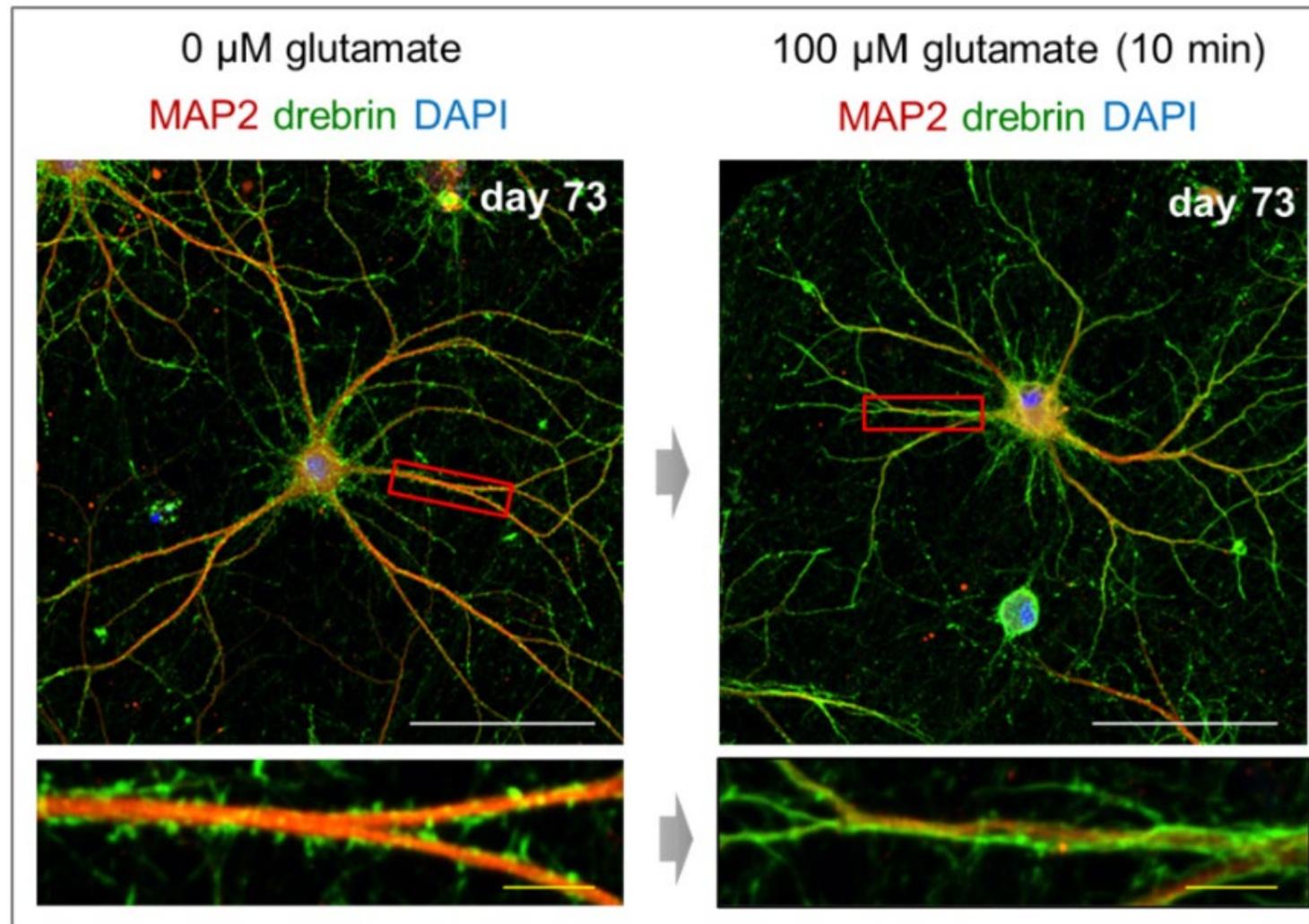
シナプス機能が成熟すると Drebrin は樹状突起スパインに集積してくる。



## Highlights

- Synaptic maturation and spinogenesis of cultured human iPSC-derived neurons
- TF-induced iPSC neurons reproduce postnatal brain development features
- Robust dendritic spine formation is shown by drebrin A expression and localization
- TF-induced iPSC neurons acquire mature functions underlying synaptic plasticity

# ラット海馬神経細胞のグルタミン酸への応答のヒト外挿性を検証



Dendritic spine formation and drebrin exodus in iPSC-derived neurons

Left: visualization of mature dendrites (red) and spines (green) at day 73 of culture after differentiation

Right: drebrin exits from the spines heads upon glutamate stimulation

(Scale bars: White = 100  $\mu\text{m}$ . Yellow = 10  $\mu\text{m}$ )

# Take home messages of the paper

1. ヒトiPS細胞由来神経細胞で、ヒト生後の脳発達の遺伝子発現プロファイルが再現できた。

The TF-induced human iPS cell-derived neurons were able to reproduce the gene expression profile of human postnatal brain development.

2. げっ歯類神経細胞で得られた実験結果がヒト神経細胞に外挿できた。

Experimental results obtained in rodent neurons were extrapolated to human neurons.

- ✓ 樹状突起スパイン形成とドレブリンAの発現と分布変化
- ✓ グルタミン酸刺激によるドレブリンエクソダス現象