

第11期採択課題

神経毒性・発達神経毒性試験の代替法のOECDTG提案を 目指したAOP475公定化のためのバリデーション研究

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	筒井泉雄	東京大学大学院農学生命科学研究科 特任研究員
	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
	田邊思帆里	国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
	吉田祥子	豊橋技術科学大学・ダイバーシティ推進センター・生命工学系 教授

インビトロ試験法開発のニーズとAOP

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

【背景】

LRI研究(8-10期)で、初代培養神経細胞で樹状突起スパインに局在するドレブリンクラスタマー数を定量解析するための頑健な実験方法を開発して、神経毒性/発達神経毒性のインビトロ試験を確立した。

「学習記憶障害を有害事象とする」神経毒性/発達神経毒性に関する有害性発現経路(AOP)を開発し、**AOP475**としてAOPwikiに登録した。

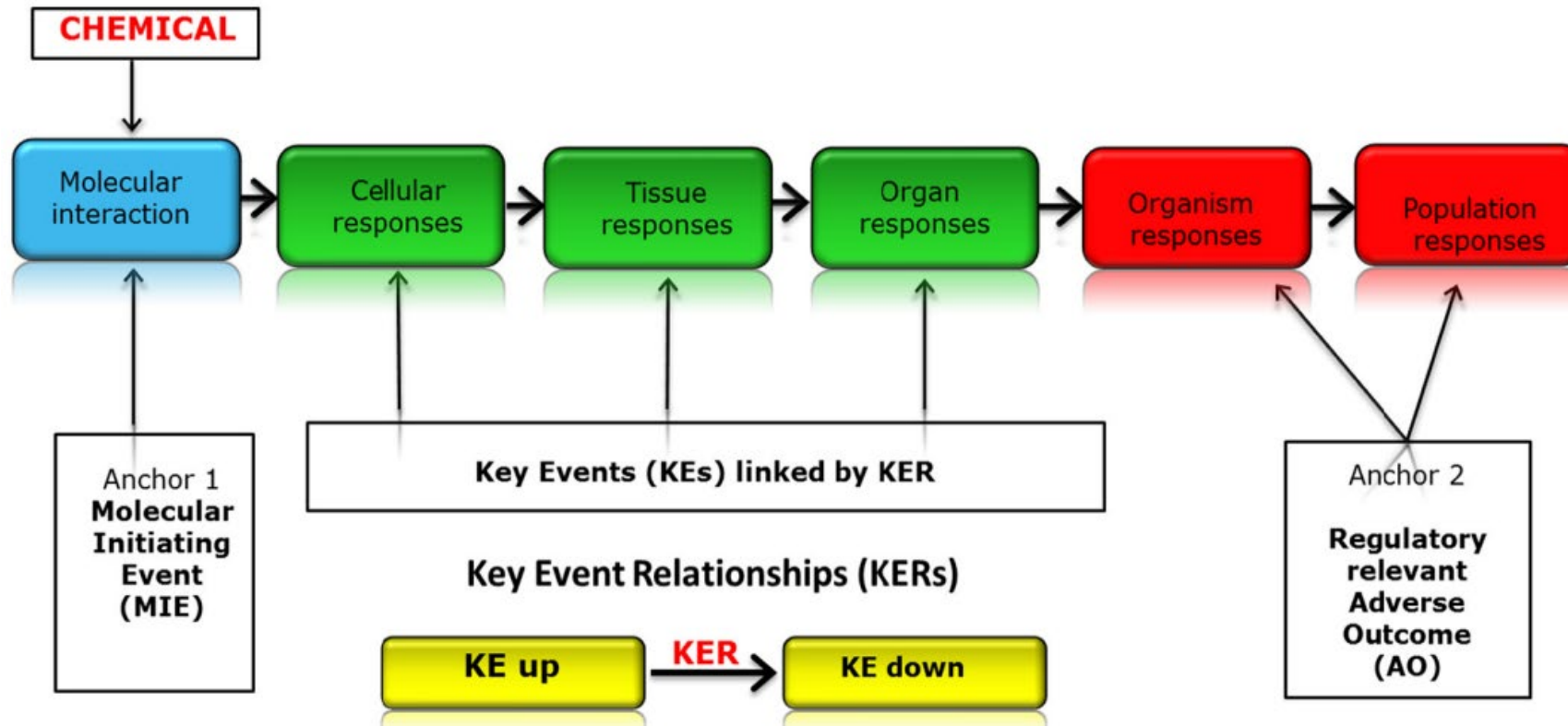
【研究目的】

- AOP475の予測性、再現性、リスク判断基準、化合物の種類に対する適応範囲、動物種の範囲など、を示すための種々のバリデーション研究を行う。
- 「規制利用の妥当性審査」に必要な実験データ並びに文献情報を収集してAOPwikiを完成する。

Adverse Outcome Pathway (AOP)とは

AOPの構成要素

化学物質などのストレスが生体内のどの部位にどのように作用して有害影響を引き起こすか。始まりは、Molecular initiating Event (MIE)からAdverse outcomeにいたるプロセスをKey Eventでつないでいく。MIE,KE,AOはこれ同士の関係性をKey Event Relationshipで表現する。KEは通常、変化の方向性、増加する(UP)と減少する(down)、というように変化の方向性ととも記述される。



Toxicology and Applied Pharmacology 354 (2018) 153–175

AOP Wikiへの投稿までの流れとその後

- AOP Wikiは、OECDのガイドラインに従って構築されたレポジトリ(貯蔵庫)である。
- AOP閲覧は自由である。
- 申請フォーマットの事前チェック: 国立医薬品食品衛生研究所から自己点検リストを入手。
- ニーズ合致性、実現要件充足性、科学的妥当性、事務手続妥当性を確認
- 何らかの規制対象であることがニーズとなる。(内分泌かく乱作用、肝障害、皮膚感作、変異原性、神経変性、学習記憶障害など。)
- Wikiに投稿したのち、コーチによる指導をうける。
- AOP Wikiの内容は、作成者が随時入力して完成させていく。
- OECDの専門家会議による査読、外部査読、を経て初めて完成度、信頼度が承認される。

AOP475 proposed by
Yuko Sekino, Shihori Tanabe, Tomoaki Shirao

MIEがグルタミン酸受容体への結合、AOが学習記憶障害のAOP

Welcome to the Collaborative Adverse Outcome Pathway Wiki (AOP-Wiki)

April 29, 2023. More details regarding the new release are available here: [Release 2.6](#).

Version 3.0? Please submit your ideas on the AOP Forum [here](#).

ここをクリック

View Content

- AOPs
- Key Events
- KE Relationships
- Prototypical Stressors

Get access to the main elements of an AOP managed in the AOP-Wiki

Download Content

Download Options

Download our content and use it in your

Get Information

Get started here... What is an AOP? Chemical Risk...

Help

Filtered AOP Count: 3

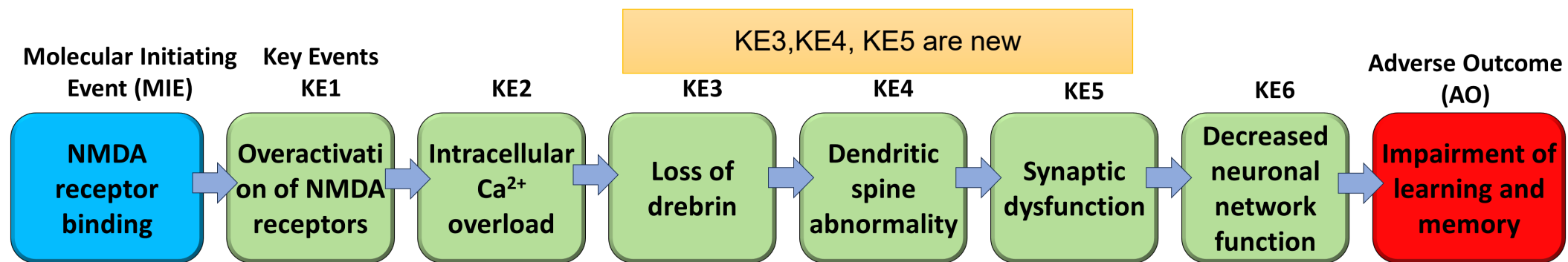
ID	Title	Point of Contact	License	MIE	AO	OECD Status	OECD Project
	glutamate		Clear		Impairment, Learning	Clear	
48	Binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain causes excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment.	Anna Price	BY-SA	<ul style="list-style-type: none">Binding of agonist, Ionotropic glutamate receptors	<ul style="list-style-type: none">Impairment, Learning and memory	WPHA/WNT Endorsed	1.23
475	Binding of chemicals to ionotropic glutamate receptors leads to impairment of learning and memory via loss of drebrin from dendritic spines of neurons	Shihori Tanabe	All rights reserved	<ul style="list-style-type: none">Binding of agonist, Ionotropic glutamate receptors	<ul style="list-style-type: none">Impairment, Learning and memory	Under Development	1.107
490	Increased glutamate leads to economic burden through	Karine Audouze	All rights reserved		<ul style="list-style-type: none">Impairment, Learning and		

ここをクリック

AOP475 “Binding of chemicals to ionotropic glutamate receptors leads to impairment of learning and memory via loss of drebrin from dendritic spines of neurons”

proposed by Yuko Sekino, Shihori Tanabe and Tomoaki Shirao

Overactivation of NMDAR induced “loss of drebrin” is directly related to “synaptic dysfunction” which leads to the impairment of learning and memory without “cell death” and “neuro-degeneration”

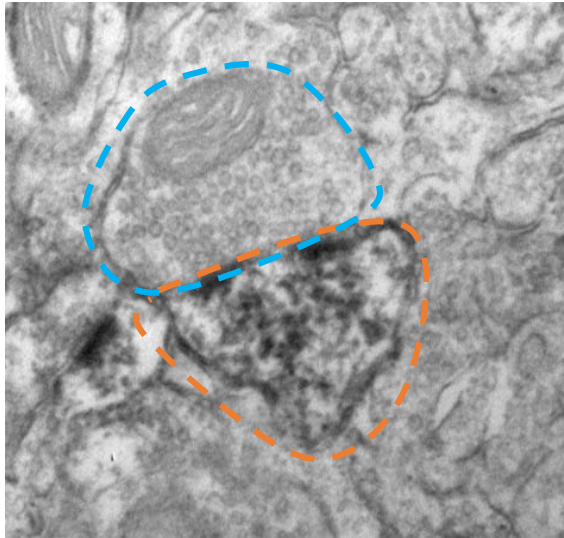


MIE, KE1 and KE2 and AO are the same as existing AOP48.

AOP475の提案プロジェクト内容:どこが新しいか？

- **既存**のAOP48は、アゴニストがイオンチャネル型グルタミン酸受容体に結合することで引き起こされる分子起動事象(MIE)により、**神経細胞死が誘発され、有害事象として学習記憶障害**が起こる。
- 最新の研究では、大脳皮質と海馬の神経細胞の樹状突起や突起上のスパインの数が減少し学習記憶障害がおきることが知られている。
- 学習と記憶の障害のリスクは、**シナプスの機能障害、具体的には樹状突起の数の減少**によって評価できる。
- 脳のアクチン結合タンパク質drebrinは、樹状突起スパインの形成に関与し、学習と記憶のメカニズムに深く関与しており、その減少はアルツハイマー病の病理脳で激減していることが知られている。
- drebrinが樹状突起スパインから持続的に消失するとシナプス機能不全が起こり学習記憶障害が起こる。これを検出するための実験プロトコルと、高コンテンツ画像解析によるdrebrinクラスターの数の自動カウントアルゴリズムをLRI研究(8~10期)で開発し、これは神経毒性スクリーニングに有用であることを示した。
- 新しいAOPの提案では、既存のAOPと同じMIEを用いつつ、drebrinの損失が学習記憶障害へのキーイベント(KE)となり、**神経細胞死がなくても学習記憶障害が起こる場合のAOP**となる。
- drebrin発現量は免疫細胞化学やELISAで測定可能であり、この方法によって化学物質の神経毒性に関するデータの蓄積が進むと期待される。

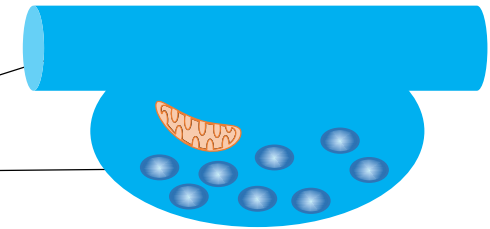
ドレブリンは成熟した神経細胞の樹状突起スパイン内のアクチンに結合している。興奮性シナプス伝達を担う樹状突起スパインの形成、記憶メカニズムに強く関与している。



免疫電顕により、ラット大脳皮質の樹状突起スパイン内のドレブリンの分布を調べた。樹状突起スパインの中心部分にクラスターを形成している。

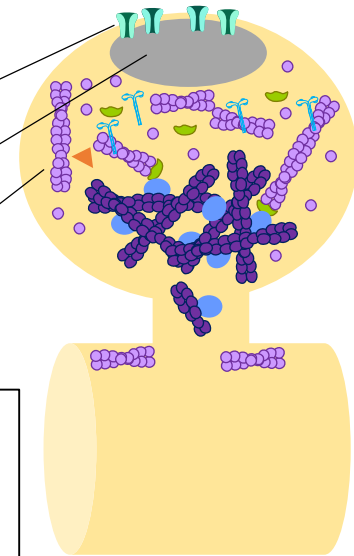
Presynaptic terminal

axon
synaptic vesicles



Dendritic spine

receptors
postsynaptic density
actin filaments



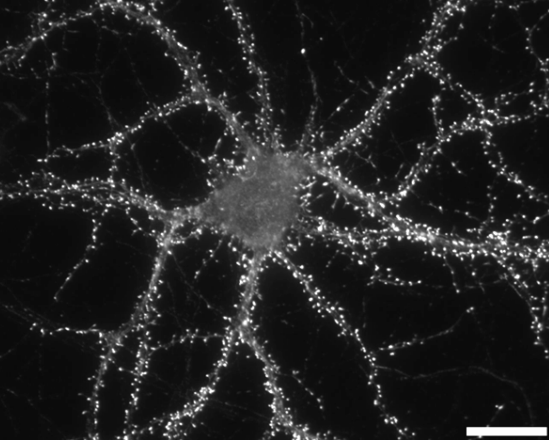
シナプス前部とシナプス後部の形態と、樹状突起スパイン表面の受容体や内部のアクチンの状態を示す模式図

KE3→KE4 Loss of drebrin leads to dendritic spine abnormality

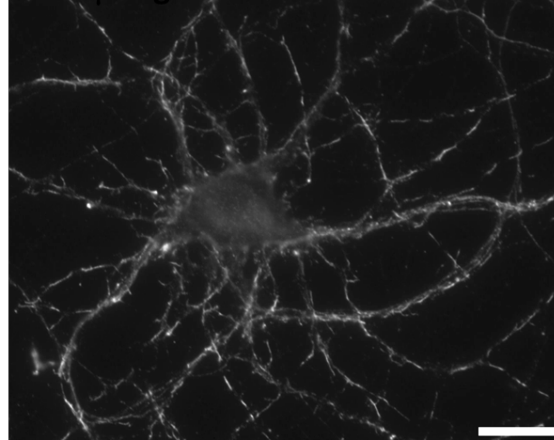
KE3 Loss of drebrin

Immunocytochemistry of drebrin

Control



100 μ M glutamate for 10 min

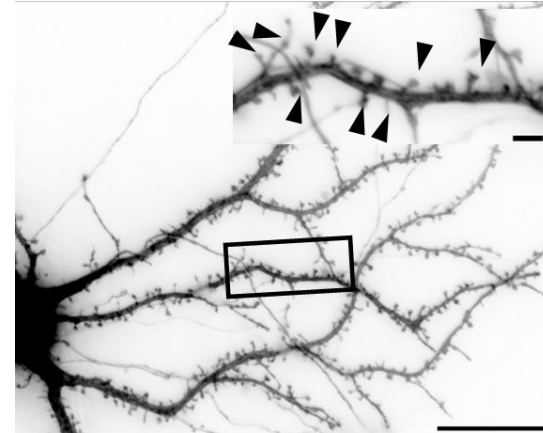


培養海馬神経細胞にグルタミン酸を投与すると、ドレブリンエクソダスがおこり、樹状突起スパイン内からドレブリンが消失する。ドット状のドレブリンクラスターが消失している。

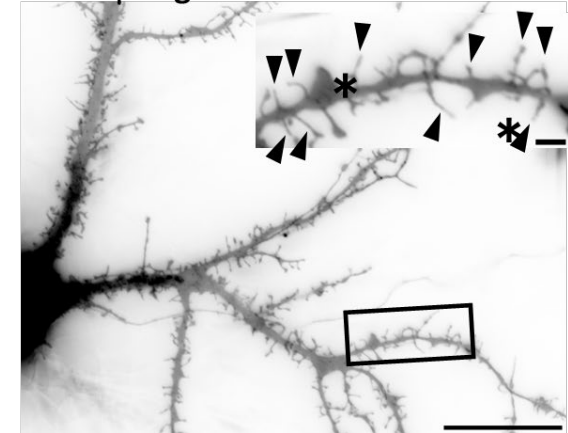
KE4 Dendritic spine abnormality

Phalloidin staining

Control



100 μ M glutamate for 10 min



グルタミン酸処理後の樹状突起スパイン形態を観察するためにファロイジンで染色した。樹状突起スパインからドレブリンが消失すると、樹状突起スパインが細く長くなることがわかる。

KE4→KE5 Dendritic spine abnormality leads to synaptic dysfunction

脳機能障害とスパイン形態の異常



Figure 1. Dendritic spine abnormalities in Patau syndrome and DS. Drawings are from Golgi preparations depicting comparable segments of apical dendrites from layer V pyramidal neurons (motor cortex). (A–E) Different developmental stages in normal subjects (5th gestational month, 7th gestational month, neonatal period, 2nd postnatal month, 8th postnatal month, respectively). (F) A newborn with 13–15 trisomy. (G) An 18-month-old infant with DS (trisomy 21). Note the progressive increase in spine density, associated with a reduction in spine length, during normal development. Spines in Patau syndrome are not only sparse, but also longer than expected for a neonate. On the other hand, the infant with DS had shorter and thicker rather than long spines. Reprinted with permission (Marr-Padilla, 1972).

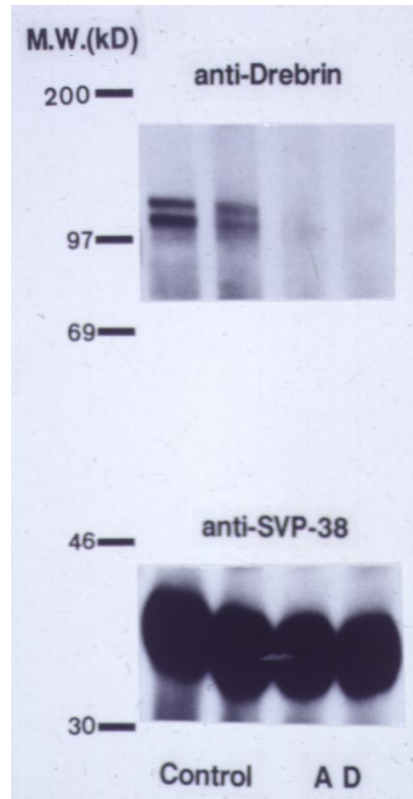
Dendritic Anomalies in Disorders Associated With Mental Retardation Cerebral Cortex 2000:10981-99 schizophrenia, AD, autism spectrum disorder, and Down syndrome, are associated with abnormalities in the number, morphology, and plasticity of dendritic spines and synapses.

[Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases.](#)

Hermes J, Dorostkar MM. Annu Rev Pathol. 2016 May 23;11:221-50. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044216. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26907528

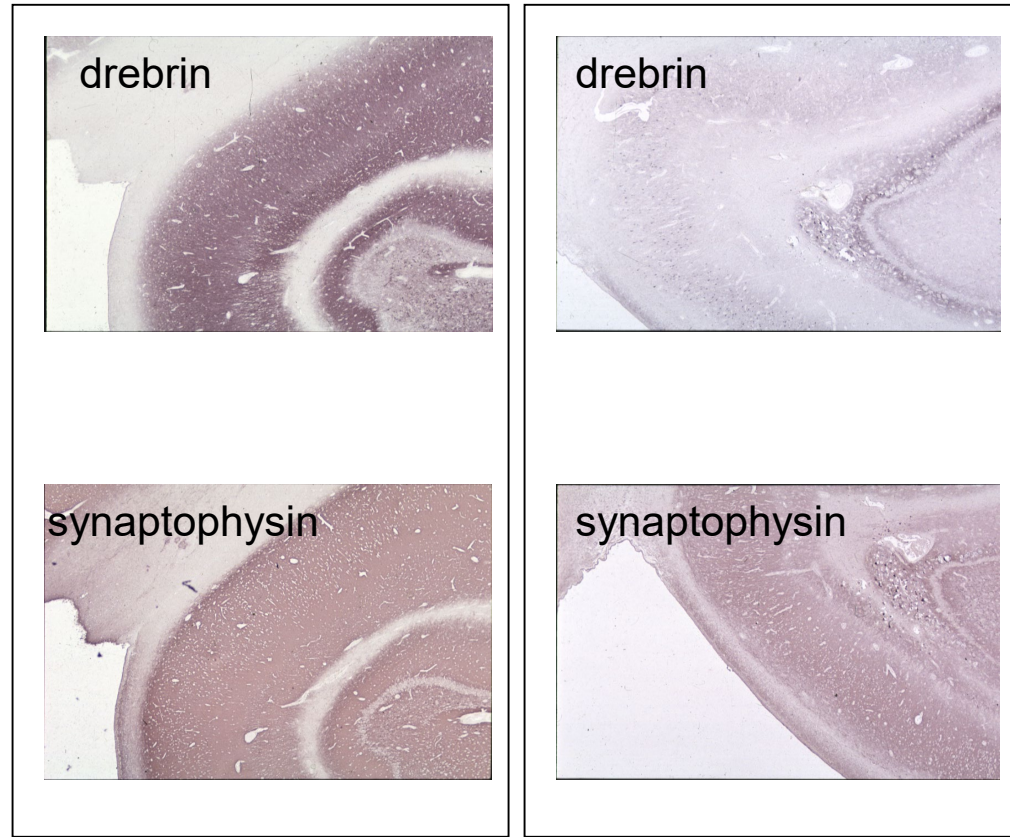
ドレブリンの消失とシナプス機能不全(学習記憶障害)の関係性

Western Blotting



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

Immunohistochemistry of Hippocampus



Aged control

AD

Loss of drebrin (KE3)の計測法

1. ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞を用いたアッセイ法

A. 凍結海馬神経細胞培養と免疫細胞染色

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 (LRI研究 第8~10期の成果)

平面性の高いプレートでの利用で、撮像時間を短縮できる。

細胞播種
1万個/穴

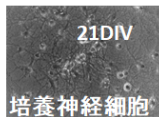
細胞数測定

細胞融解

凍結神経細胞
ラット胎仔(E17)
の海馬から作成

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(アルメッド(株))を使用する

無血清培養(3週間)
化合物投与(発達神経毒性)



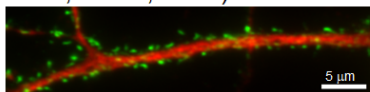
薬物投与法の改善

神経毒性:
化合物の投与

免疫染色
(drebrin, MAP2, DAPI)

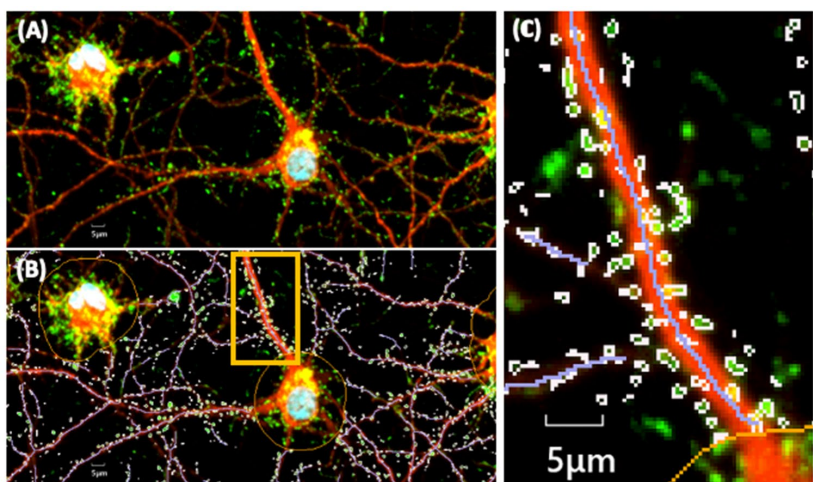
ハイコンテンツアナリシス

画像取得・解析の自動化



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。

B. ドレブリンクラスター数の自動測定法 (CQ1とセルパスファインダー)



2. ELISA法による定量的解析

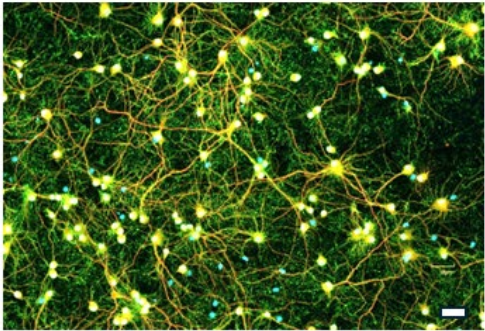


ELISA kit, AlzMed Inc.

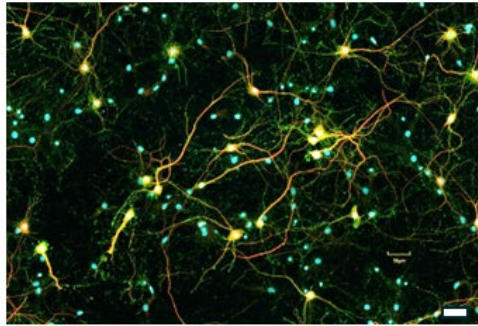
ロテノンの発達神経毒性の実験

ロテノンを培養14日後に添加し7日間培養した海馬神経細胞

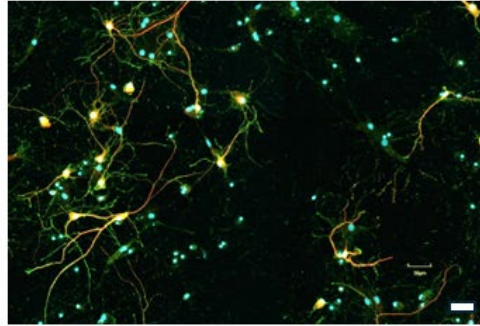
A. Control



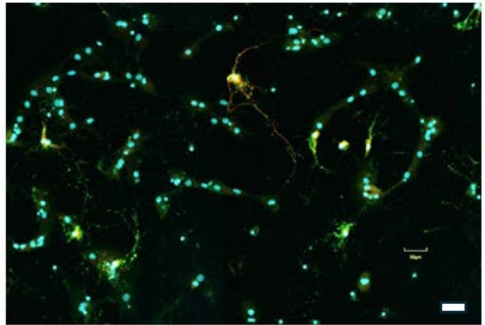
B. 1 μ M Rotenone



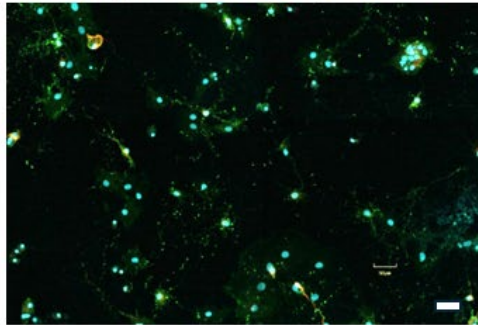
C. 3 μ M Rotenone



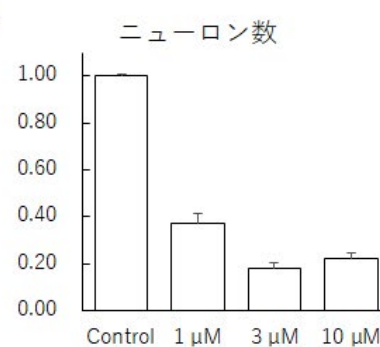
D. 10 μ M Rotenone



E. 30 μ M Rotenone



F.



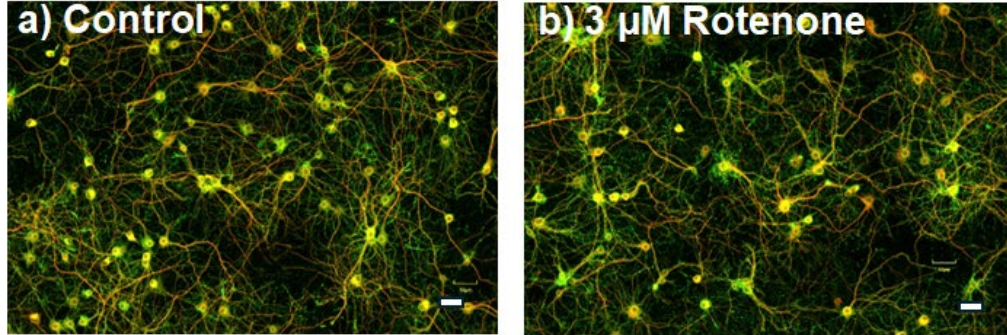
強い発達神経毒性が認められ、神経細胞の生存率が20%である。
この場合には、ドレブリンクラスター数は毒性の指標とはならない。

各濃度の薬液投与は、96ウェルプレート
の6ウェルに行っている。写真撮影は、
各ウェルの中心部を4×4で16枚の
画像を取得している。各画像を自動的
に解析して、細胞数、樹状突起長、ド
レブリンクラスター数を算出して、統
計解析はウェルごとに16 field合計の
数字を算出しておこなった。検定は、
n=6の平均値を用いて行った。写真は
CQ1で撮影した各濃度の96枚の写真の
うち代表的なもの1枚を掲載した (A~
E)。残存細胞数をコントロールと比
較したものがFである。1 μ Mのロテノ
ンで強い神経細胞毒性が観察された。
DAPI染色陽性信号が残存しており、こ
れらがもしもグリア細胞由来であれば、
神経細胞に選択的な毒性があることと
なる。赤：抗MAP2抗体染色、緑：抗
ドレブリン染色、青：DAPI染色 ス
ケールは50 μ m

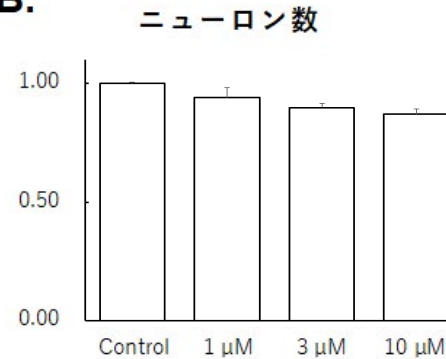
ロテノンの神経毒性の実験

ロテノンを培養21日後に添加し1日後の神経細胞の生存率と形態

A.



B.

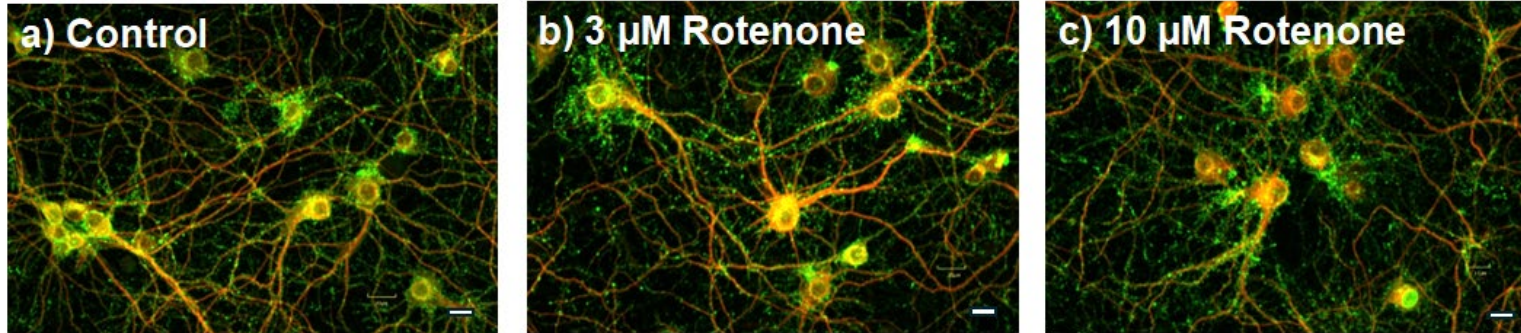


A : ロテノンで神経細胞死が観察された。a) 溶媒対照の培養神経細胞の密度 b) 3 μ Mロテノンで観察された細胞数の減少

B : 3 μ M、10 μ Mで有意な神経細胞死が観察された。

C : 未発表データのため詳細は割愛する。

C.



今後、ドレブリンクラスター数減少が神経細胞死より前に起こるかどうかについて、短い投与時間での実験を行う。

まとめ

SUMMARY

- 1. The impairment of learning and memory occurs even in the absence of neuronal cell death.**
- 2. The loss of drebrin from dendritic spines of cultured neurons is a suitable key event linked to the impairment of learning and memory.**
- 3. Drebrin expression levels can be measured by immunocytochemistry.**
- 4. AI analysis also represented neurotoxic risk of rotenone quantitatively.**
- 5. The quantitative analysis of drebrin cluster using neuronal culture will promote the accumulation of data on the neurotoxicity of chemical substances.**

This work was supported by the Japan Chemical Industry Association (JCIA) Long-range Research Initiative (LRI) to YS , and the Regulatory Science Research Grant from MHLW (2020-2022) to YS

Contact to Yuko Sekino, PhD. yukos@g.ecc.u-tokyo.ac.jp