

## 第13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           |
| 研究協力者 | 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          |
|       | 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 |
|       | 横田理   | 国立医薬品食品衛生研究所     | 毒性部 第二室長       |
|       | 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   |

# 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。

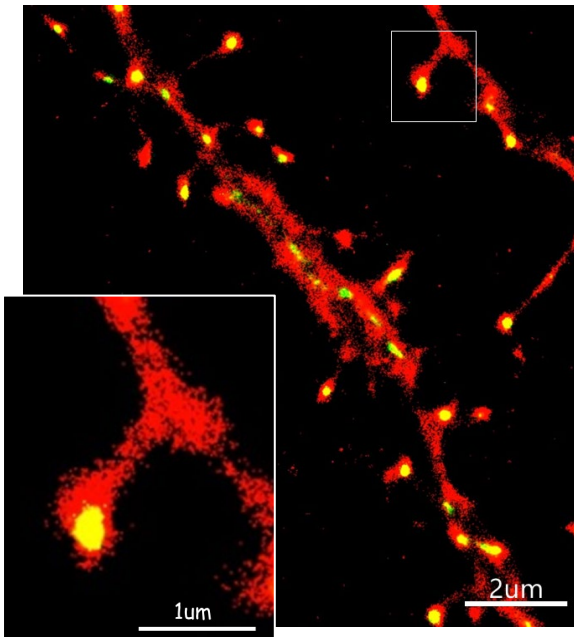
「学習記憶障害を有害事象とする」神経毒性/発達神経毒性に関する有害性発現経路(AOP)を開発し、AOP475としてAOPwikiに登録した。

## 【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。

# 神経毒性/発達神経毒性: 学習記憶障害をもたらす Loss of drebrin

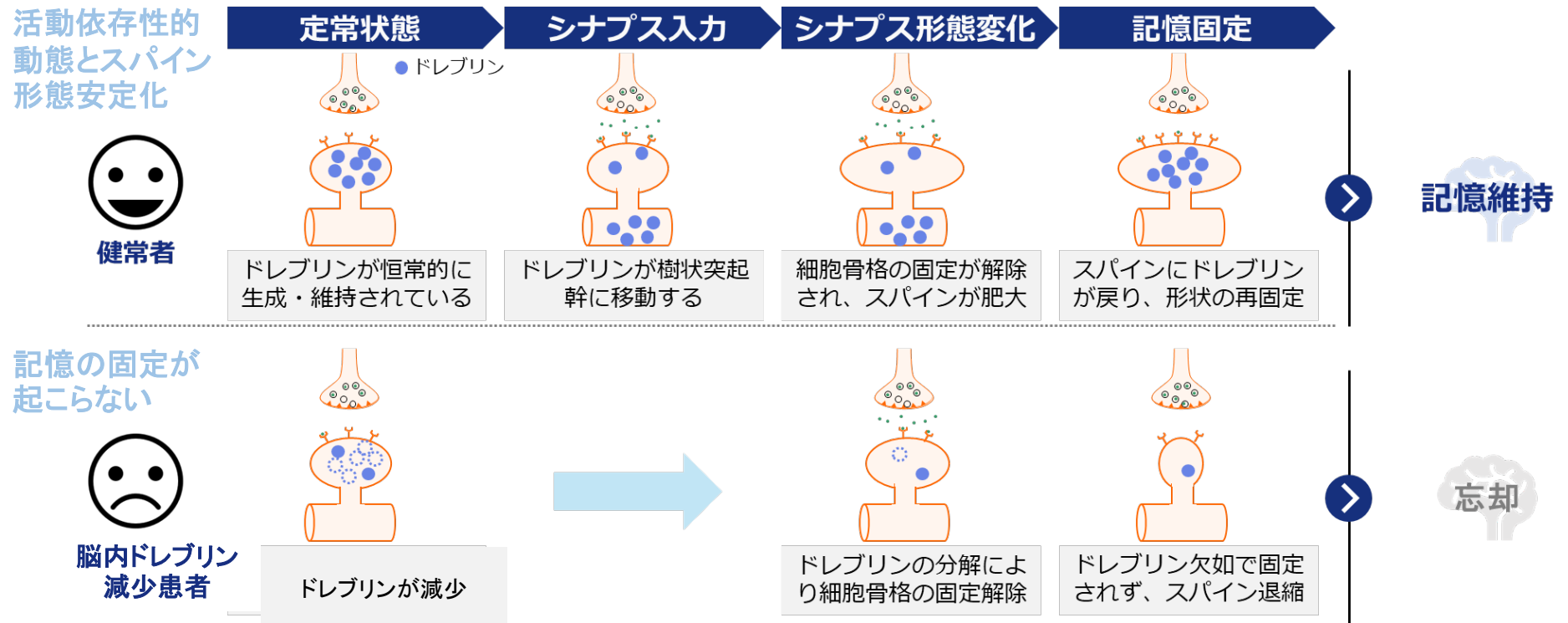
ドレブリンは、神経細胞の樹状突起スパインの中心領域に局在する



超解像顕微鏡 (STORM) による観察。赤色は、樹状突起とスパインを示す。黄色は、ドレブリンの局在を示す。

(Koganezawa et al., 2017)

ヒト認知症脳の病理、実験動物樹状突起スパインからのドレブリン消失 (Loss of drebrin) は、記憶障害につながる。



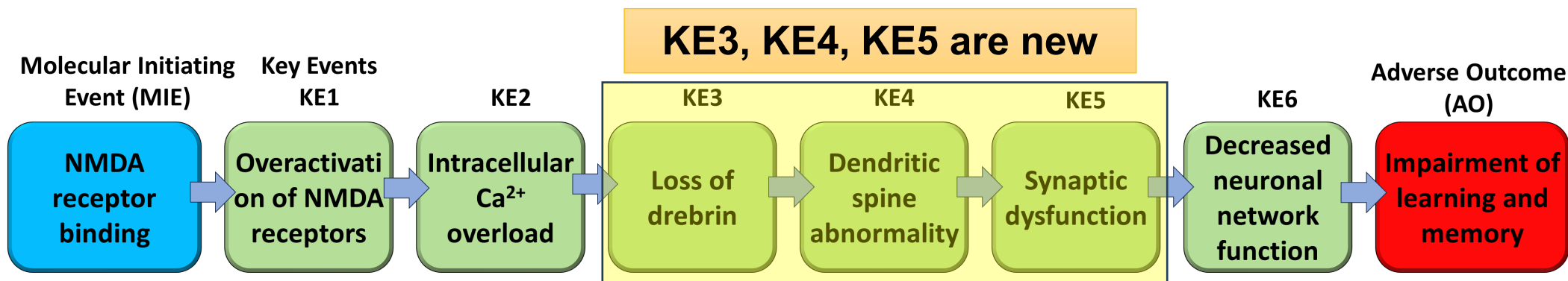
を示し、樹状突起スパインの大きさ、受容体数の変化など、記憶学習のシナプス可塑性を担っている

# 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

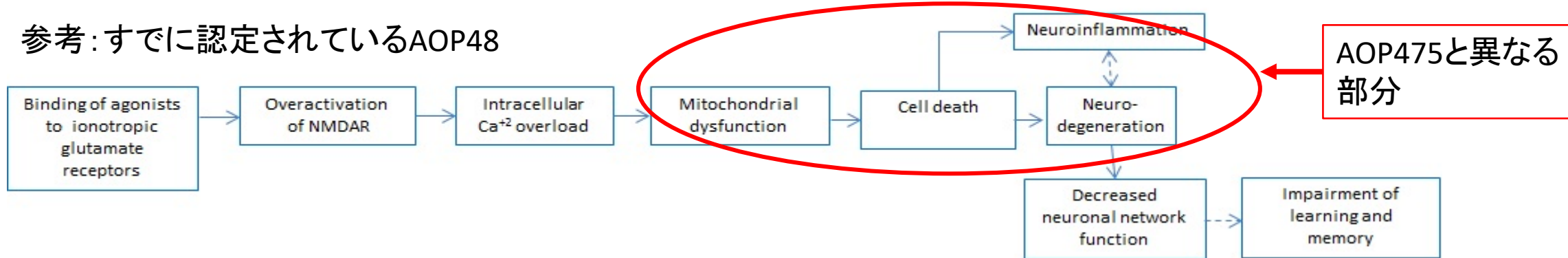
Overactivation of NMDAR induced “loss of drebrin” is directly related to “synaptic dysfunction” which leads to the impairment of learning and memory

第11期にAOPのコーチングを受けて、第10期の提案よりもシンプルなAOPとなった。



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

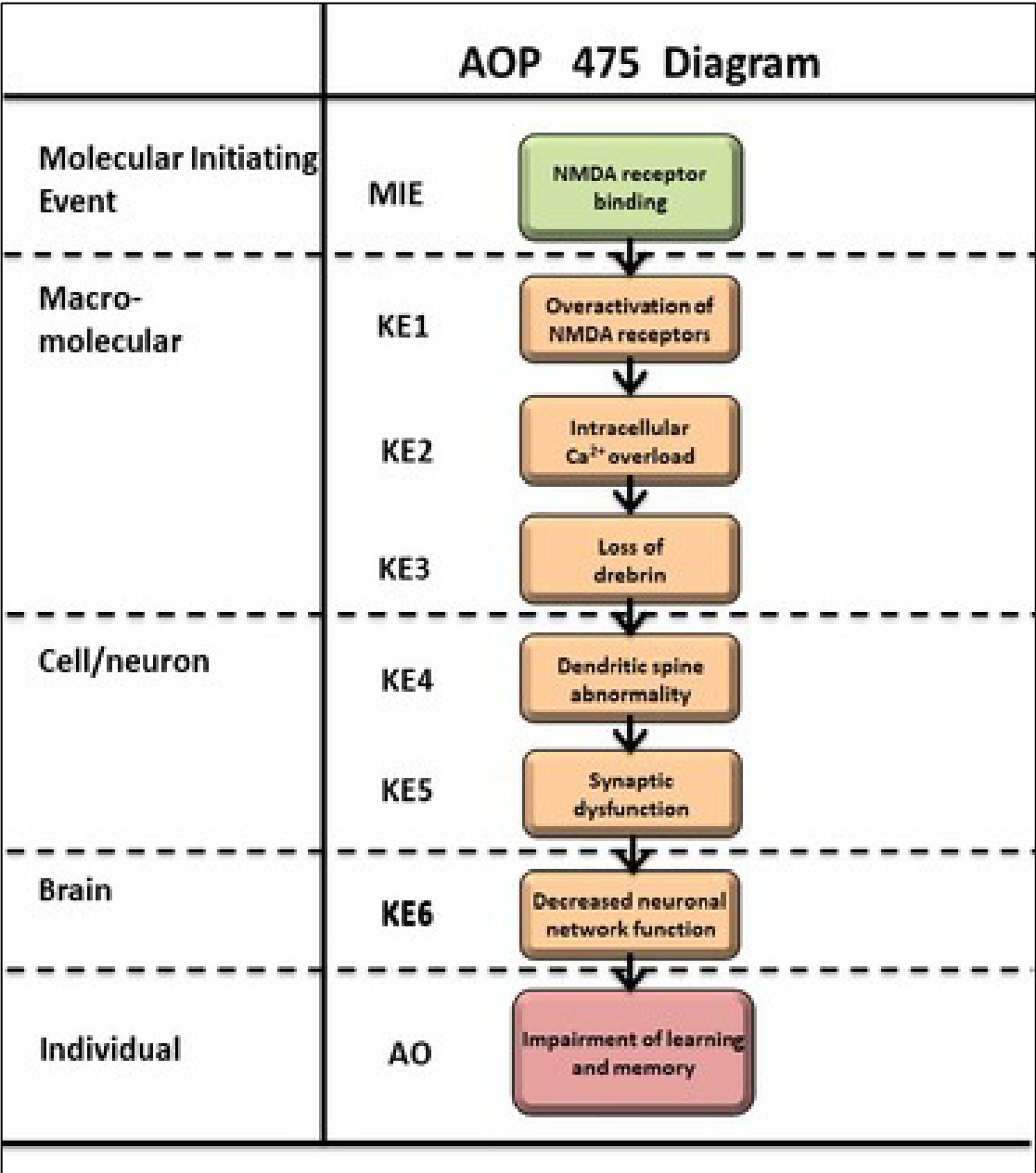
参考: すでに認定されているAOP48



# 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。

# AOP475のストラクチャー



| Type | Event ID | Title                                              | Short name                                         |
|------|----------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| MIE  | 875      | Binding of agonist, Ionotropic glutamate receptors | Binding of agonist, Ionotropic glutamate receptors |
| KE   | 388      | Overactivation, NMDARs                             | Overactivation, NMDARs                             |
| KE   | 389      | Increased, Intracellular Calcium overload          | Increased, Intracellular Calcium overload          |
| KE   | 2078     | Loss of drebrin                                    | Loss of drebrin                                    |
| KE   | 2242     | Abnormality, dendritic spine morphology            | Dendritic spine abnormality                        |
| KE   | 1944     | Synaptic dysfunction                               | Dysfunctional synapses                             |
| KE   | 386      | Decrease of neuronal network function              | Neuronal network function, Decreased               |
| AO   | 341      | Impairment, Learning and memory                    | Impairment, Learning and memory                    |

# Event 2078 (Loss of drebrin) のKey Event Description

Glutamate induces the translocation of drebrin from dendritic spines to dendritic shafts, as reported in mature cultured rodent neurons and human iPS-derived neurons (Sekino et al. 2006; Mizui et al. 2014; Lin et al. 2023). This "drebrin exodus" is a physiological process occurring at the initiation of synaptic plasticity, observed immediately after excitatory postsynapses receive electrical or chemical stimulation that induces long-term potentiation (LTP) or long-term depression (LTD) .

NMDA-induced excitotoxicity leads to the degradation of drebrin in mature cultured neurons from rodent hippocampus and cortex. This process is triggered by calcium influx and mediated by calpain activity.

Drebrin is an evolutionarily conserved actin-binding protein localized in dendritic spines. Overexpression of drebrin A in neurons enlarges dendritic spines and reduces spine motility, whereas down-regulation of drebrin A decreases the density and width of dendritic spines and inhibits the synaptic clustering of NMDA receptors (NMDARs).

Drebrin stabilizes actin filaments and plays a pivotal role in dendritic spine morphogenesis (Hayashi and Shirao, 1999; Takahashi et al., 2003; Takahashi et al., 2006).

During the initial stages of synaptic plasticity (either LTP or LTD),  $\text{Ca}^{2+}$  influx through NMDA receptors triggers the translocation of drebrin from dendritic spines (Sekino et al., 2006).

Moreover, prolonged NMDA-induced excitotoxicity results in calpain-mediated degradation of drebrin both in vitro and in vivo.

## グルタミン酸によるdreブリンの移動

グルタミン酸刺激により、dreブリンは樹状突起棘から樹状突起軸へ移動し、シナプス可塑性と強く関係する。

## NMDA誘発興奮毒性による分解

NMDA誘発興奮毒性は、カルシウム流入を引き金としてカルパイン活性を介したdreブリンの分解を引き起こす。

## dreブリンの基本特性

dreブリンはアクチン結合タンパク質で、主に樹状突起スパインに局在してスパイン形成や形態変化を担っている。

## 機能

dreブリンはアクチンフィラメントを安定化し、NMDA受容体を介した $\text{Ca}^{2+}$ 流入により移動または分解される

# KE3 (Event 2078) → KE4 (Event 2242) Relationship 3298

## Loss of drebrin leads to Dendritic spine abnormality

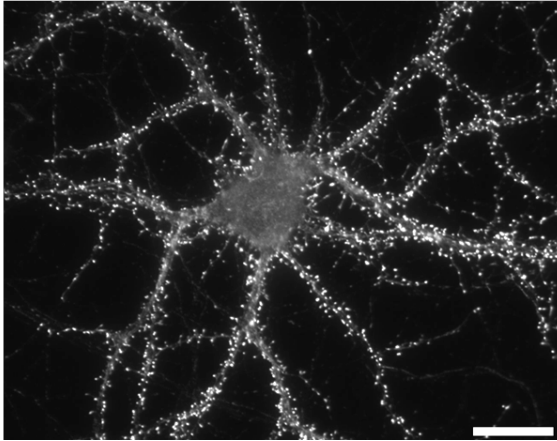
### Key Event Relationship Description

Drebrin interacts with actin filaments to stabilize and reorganize the actin cytoskeleton within dendritic spines, and plays important roles in regulating spine morphology and synaptic plasticity. Loss of drebrin results in a reduction of mature mushroom-shaped spines and an increase in thin or immature filopodia-like spines.

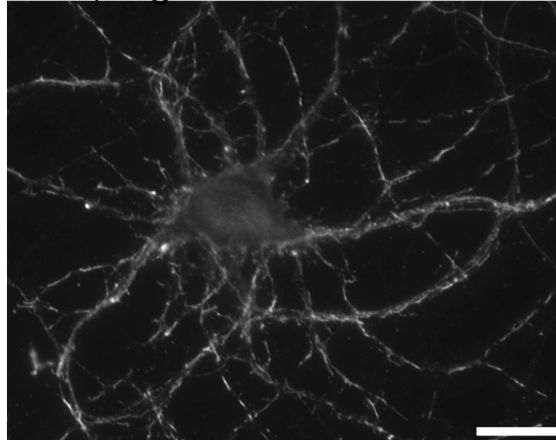
### Loss of drebrin

Immunocytochemistry of drebrin

Control



100  $\mu$ M glutamate for 10 min

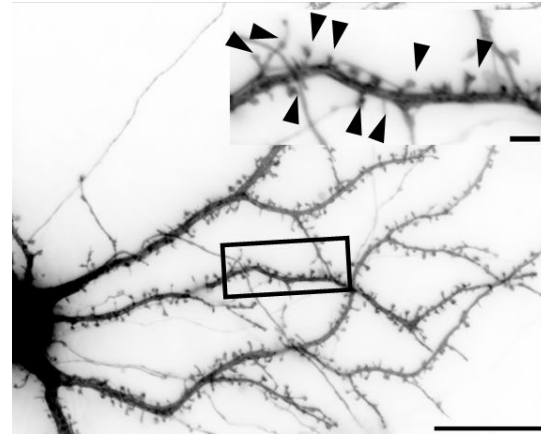


培養海馬神経細胞にグルタミン酸を投与すると、drebrinエクソダスがおこり、樹状突起スパイン内からdrebrinが消失する。  
ドット状のdrebrinクラスターが消失している。

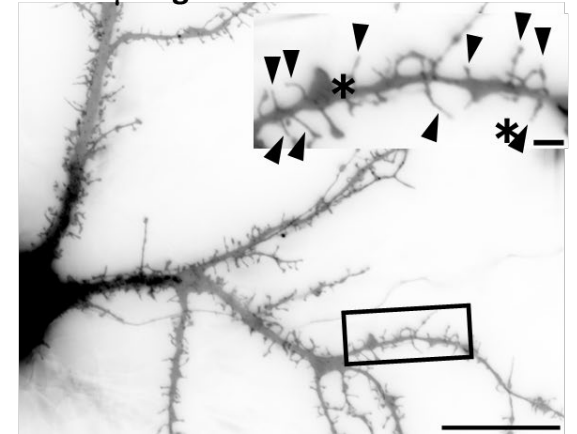
### Dendritic spine abnormality

Phalloidin staining

Control



100  $\mu$ M glutamate for 10 min



グルタミン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drebrin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 (Event 2242) → KE5 (Event 1944) Relation 3301

## 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 (Marrero-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

# KE2078: How it is Measured or detected

この部分が、AOPのイベントにおいて最も重要な部分であり、NAMSに対応する。

## How It Is Measured or Detected



Loss of drebrin from dendritic spines can be detected by immunocytochemistry, ELISA or or Western blotting in cultured human and rodent neurons and brain tissues (Counts et al., 2006; Ishizuka et al., 2014).

The twenty-one-day primary cultured neurons were prepared using frozen stock of dissociated hippocampal neurons (Koganezawa et al, 2023; Hanamura et al 2019). In brief, cells were cultured in multi well microplates with defined medium. Using cryopreserved hippocampal neurons reduces animal use.

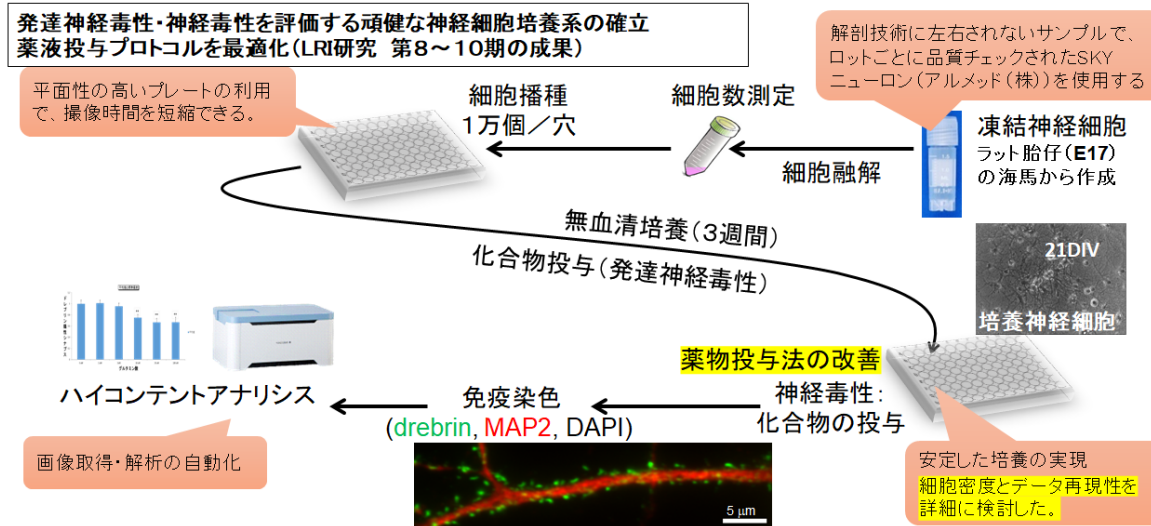
For enzyme-linked immunoassay, after the incubation of chemicals the extracts of neurons were quantified using ELISA kit for drebrin (ALzMEd, Inc.),

For immunocytochemistry, the cultured neurons were incubated with chemicals for 1 hour. After fixation, cultured neurons were immunostained with anti-drebrin and anti-MAP2 antibodies. The cluster density of drebrin along the dendrites was automatically quantified using high content analysis instruments (Hanamura et al, 2019, Mitsuoka et al, 2019).

# Loss of drebrin (KE3) の計測法

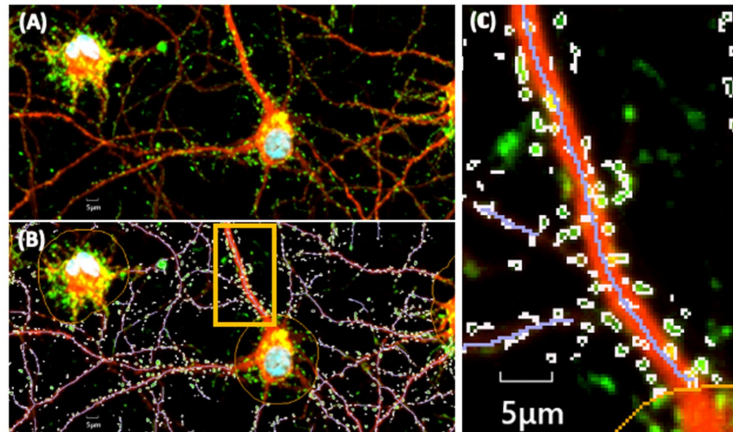
## 1. 細胞免染 Synaptox Drebrin Cluster (DC) 法

### A. 標準化されたラット胎仔由来凍結海馬神経細胞の培養法



### B. 3週間培養後のdreブリンクラスター数の自動測定法

(CQ1による撮影と  
セルパスファイン  
ダーによる解析)



## 2. ELISA法 Syncheck™による定量的解析

アルメッド社が開発したものを購入し、脳dreブリン  
量の変化のデータを取得開始



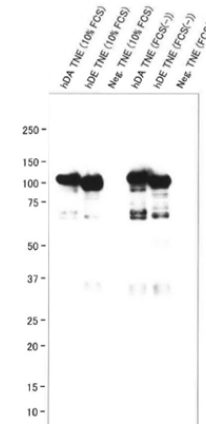
ELISA kit, AlzMed Inc.

hDrebrin-A ELISA kit (Antibodies AA014 and AA002)

|          | Human drebrin A HEK lysate |         | Human drebrin E HEK lysate |       | HEK lysate |       |
|----------|----------------------------|---------|----------------------------|-------|------------|-------|
| dilution | OD450                      | ng/mL   | OD450                      | ng/mL | OD450      | ng/mL |
| 100      | 3.078                      | 5805.70 | -0.001                     | ND    | -0.021     | ND    |
| 1000     | 0.597                      | 9547.00 | -0.027                     | ND    | -0.018     | ND    |
| 10000    | 0.063                      | 8030.00 | -0.028                     | ND    |            |       |

hDrebrins ELISA kit (Antibodies AA014 and AA003)

|          | Human drebrin A HEK lysate |         | Human drebrin E HEK lysate |          | HEK lysate |       |
|----------|----------------------------|---------|----------------------------|----------|------------|-------|
| dilution | OD450                      | ng/mL   | OD450                      | ng/mL    | OD450      | ng/mL |
| 100      | 2.889                      | 1409.90 | 2.881                      | 1404.60  | -0.013     | ND    |
| 1000     | 2.141                      | 9348.00 | 2.349                      | 10616.00 | -0.006     | ND    |
| 10000    | 0.261                      | 5220.00 | 0.248                      | 4860.00  |            |       |



# Synaptox DC法 とSyncheck™データのヒト外挿性について

## Synaptox DC法（培養神経細胞のドレブリン発現と局在に関するデータの同等性）

1. ヒトiPS細胞由来神経細胞において、
  - 1-1. 樹状突起スパインの形成・成熟過程でドレブリンのアイソフォーム変換が起こること
  - 1-2. シナプス成熟後の樹状突起スパインにドレブリンが局在すること
2. 成熟した神経細胞で樹状突起スパインに集積したドレブリンはグルタミン酸投与（NMDA受容体活性化）により、ドレブリンクラスターが消失すること。

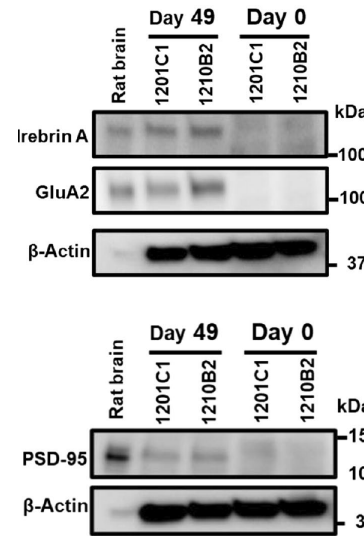
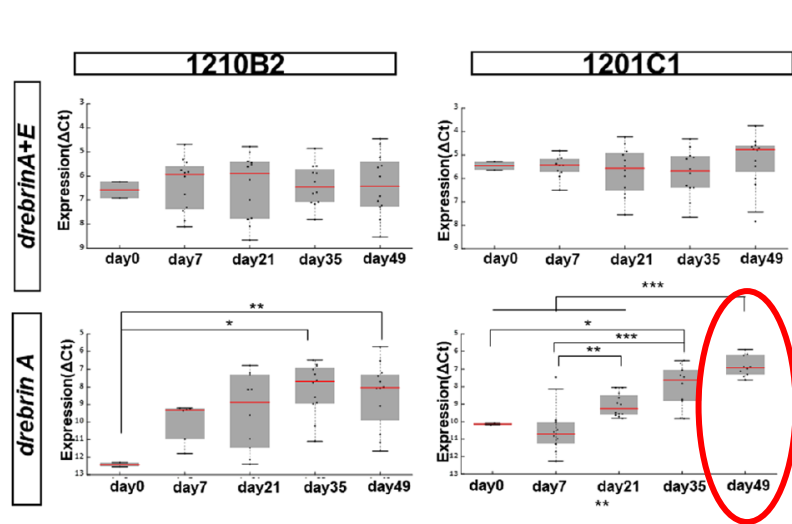
## Syncheck™（血漿ドレブリン減少はシナプス可塑性不全のサロゲートマーカー）

1. 正常人の血漿中にはドレブリン代謝物が存在し、Syncheck™で測定できるが、軽度認知症の場合には、Syncheck™でドレブリンが測定できなくなった。
2. 記憶障害を起こす化合物を投与したげっ歯類の血漿でドレブリン代謝産物を測定できるか、検証中である。

# ヒトiPS細胞由来神経細胞(hiPS-N)の成熟過程におけるdrebrinの発現

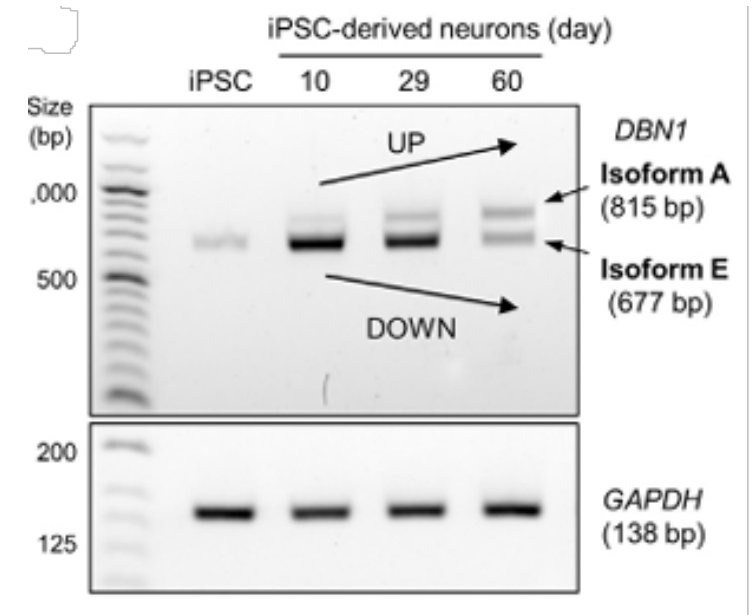
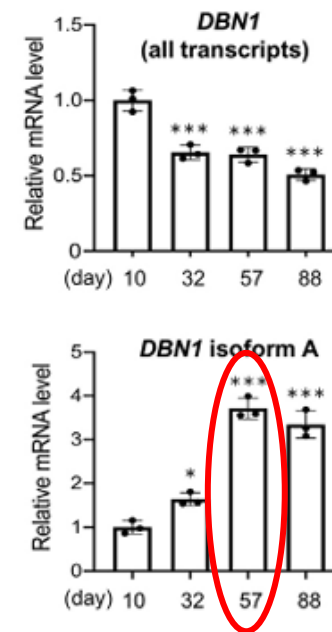
## エビデンス1

Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro. Togo K, Fukusumi H, Shofuda T, Ohnishi H, Yamazaki H, Hayashi MK, Kawasaki N, Takei N, Nakazawa T, Saito Y, Baba K, Hashimoto H, Sekino Y, Shirao T, Mochizuki H, Kanemura Y. Mol Brain. 2021 Oct 11;14(1):149. doi: 10.1186/s13041-021-00851-1.



## エビデンス2

Dendritic spine formation and synapse maturation in transcription factor-induced human iPSC-derived neurons. Lin W, Shiimoto S, Yamada S, Watanabe H, Kawashima Y, Eguchi Y, Muramatsu K, Sekino Y. iScience. 2023 Feb 27;26(4):106285.



hiPS-Nの成熟過程でのdrebrin発現については、げっ歯類神経細胞の成熟過程と同様に、①シナプス形成期にdrebrin Eからdrebrin Aへのアイソフォーム変換が起こった。②シナプス成熟後は脳型drebrin Aの発現がドミナントとなった。drebrin Aの発現がドミナントになるのは、げっ歯類培養神経細胞では21日後であるが、hiPS-Nでは概ね50日かかった。

# 成熟したhiPS-Nでのdrebrinの局在とグルタミン酸刺激による局在変化

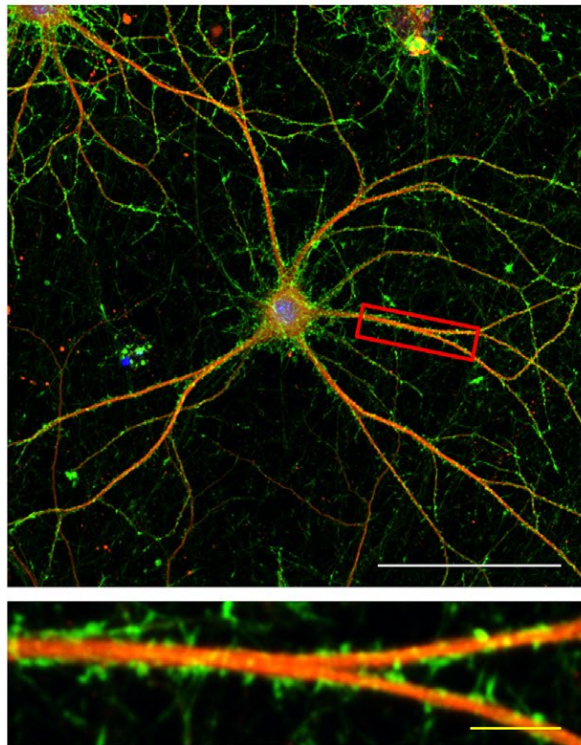
Dendritic spine formation and synapse maturation in transcription factor-induced human iPSC-derived neurons.

Lin W, Shiimoto S, Yamada S, Watanabe H, Kawashima Y, Eguchi Y, Muramatsu K, Sekino Y.

iScience. 2023 Feb 27;26(4):106285.

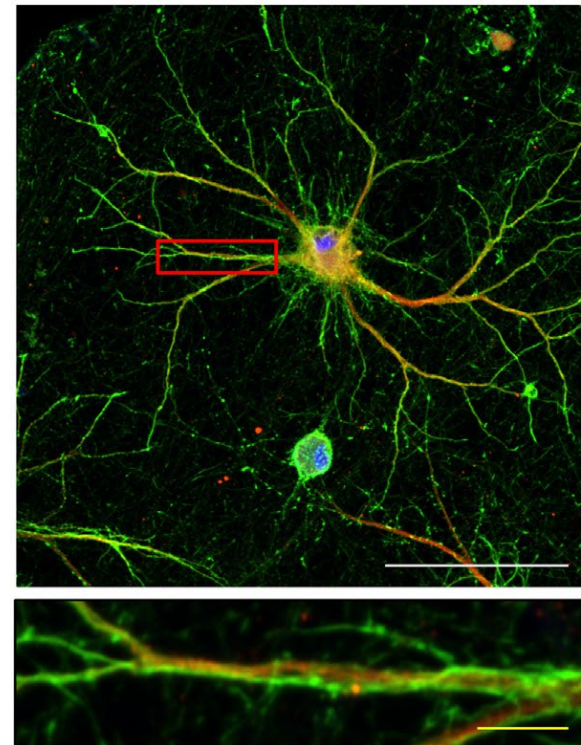
0  $\mu$ M glutamate

MAP2 drebrin DAPI



100  $\mu$ M glutamate (10 min)

MAP2 drebrin DAPI



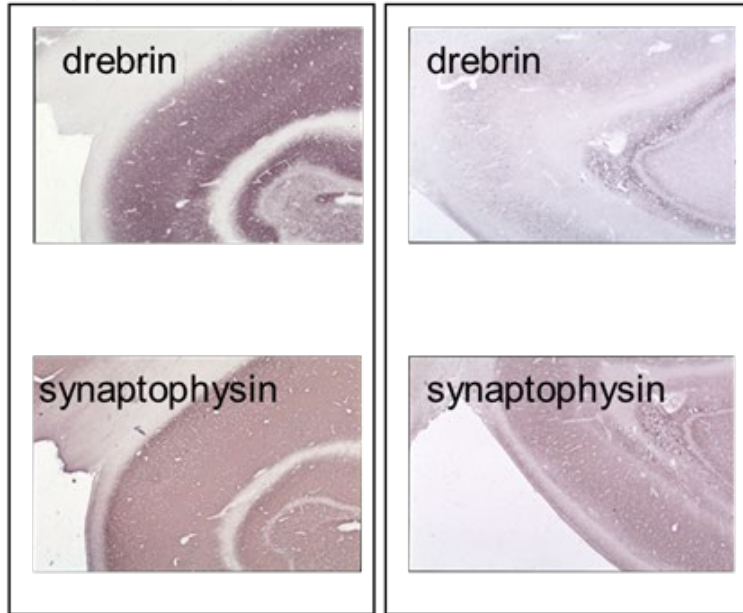
成熟したhiPS-N(培養73日)で、drebrinが樹状突起スパインに局在した。これは、成熟したげっ歯類神経細胞でみられる分布と同様であった。また、100  $\mu$ M グルタミン酸10分刺激で、げっ歯類神経細胞と同じように樹状突起スパインからdrebrinが消失して樹状突起幹に移動する現象が確認された。

# ヒト脳: Loss of drebrinとImpairment of Learning and Memoryの関係性

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

東海林、白尾らの発表

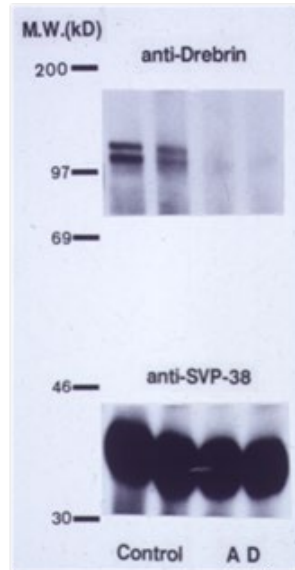
Immunohistochemistry  
Hippocampus



Aged control

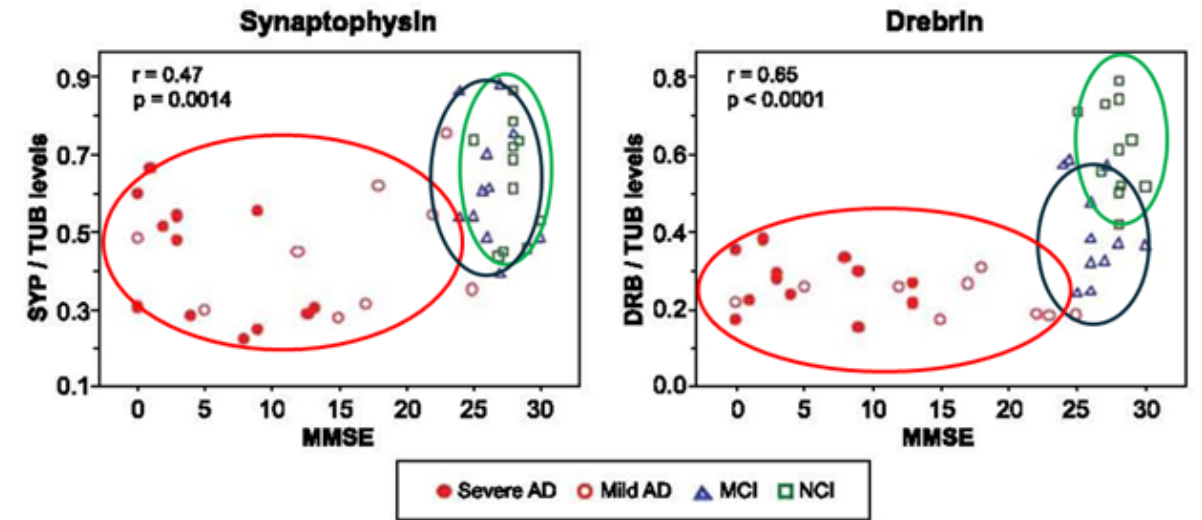
AD

Western Blotting



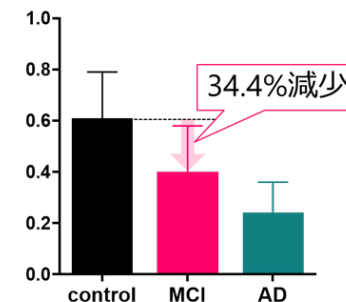
Counts et al., *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006

MMSEスコアが25~30でドレブリンは減少するがシナプトフィジンは減少しない。

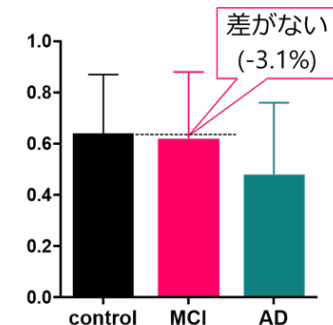


ヒト死後脳の病理標本の解析結果

ドレブリン  
(ポストシナプスマーカー)



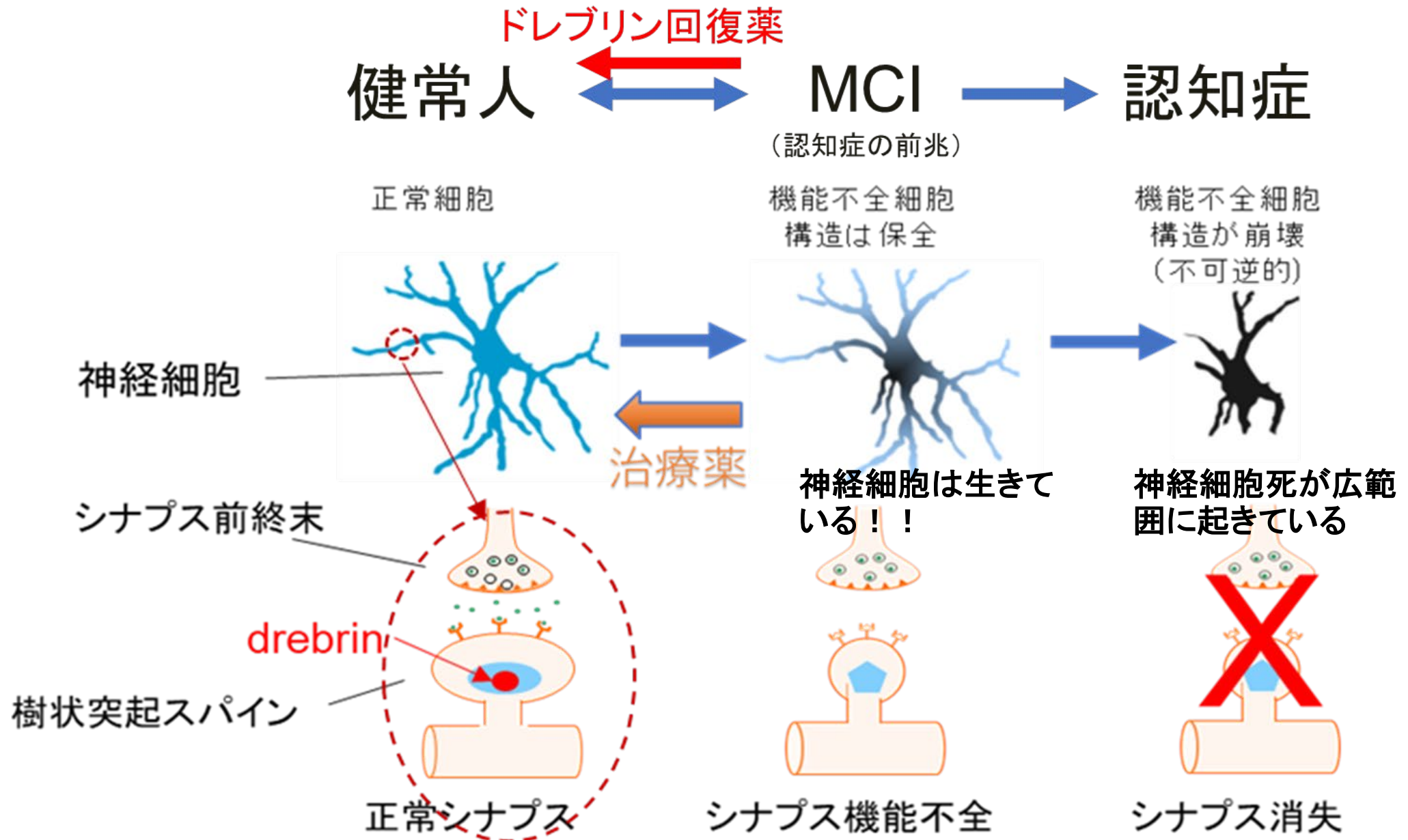
従来シナプスマーカー



(Counts et al., 2006)

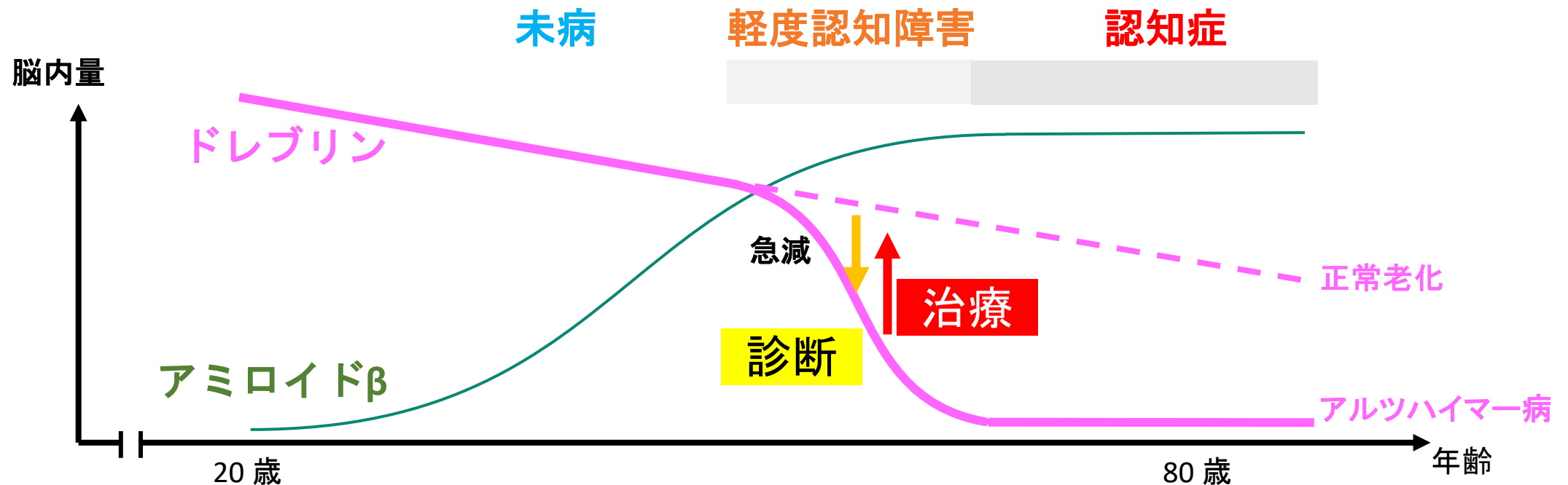
# ヒト軽度認知症のステージ

Loss of drebrin, Dendritic spine abnormality, Synaptic dysfunctionが認められる



# 血漿中ドレブリンで軽度認知症を判定できる可能性を示唆

脳内ドレブリンは軽度認知障害で急激に減少する。  
分解産物を血漿で検出できる可能性がある。



(剖検脳で、脳内ドレブリンの異常減少を示した論文)

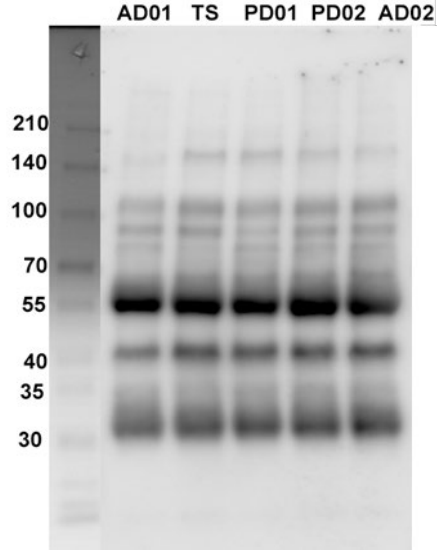
Harigaya, **Shirao**, et al. J Neurosci Res. 1996 Jan 1;43(1):87-92.  
Hatanpaa, **Shirao**, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 1999 Jun;58(6):637-43.  
Counts, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2006 Jun;65(6):592-601.

(動物実験で治療の可能性を示した論文)

Puspitasari, **Shirao**, et al. Radiat Res. 2016 Apr;185(4):423-30  
Liu Y, et al. CNS Neurosci Ther. 2017 Jul;23(7):590-604

# 軽度認知症患者の血漿ドレブリン代謝物は認知機能正常者の10分の1 化学物質毒性試験がげっ歯類の血漿検査で行える可能性が示された

## ヒト血漿中ドレブリン代謝産物の ウェスタンブロット



ドレブリン抗体によるウェスタンブロット

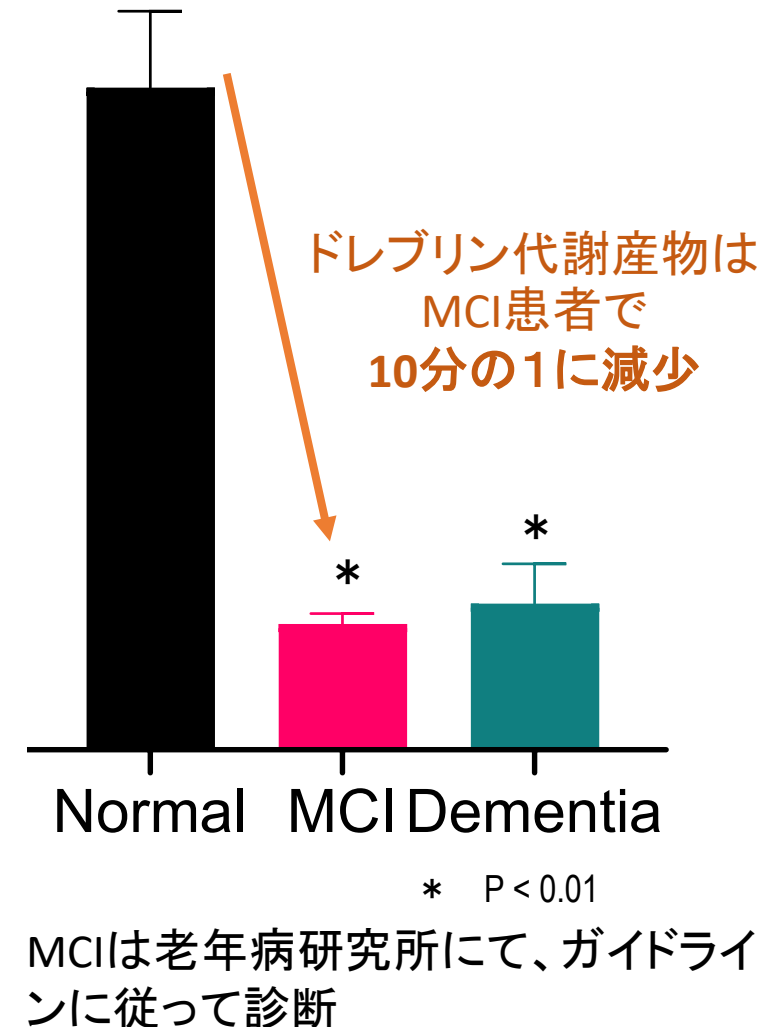
ヒト血漿中には、ドレブリンの分解産物が多数存在することを発見した。げっ歯類の血漿にもドレブリン分解産物を見出した。  
ADはアルツハイマー病  
TSは健常高齢者  
Pはパーキンソン病

## ドレブリン代謝産物定量化のための ELISAキット Synccheck™



ウェスタンブロット法では定量化できないので、サンドイッチELISAキットを開発した。  
ヒトとげっ歯類のドレブリン配列の相同性から本ELISAはヒトとげっ歯類の両方で血漿中のドレブリン分解産物測定が可能である。

## MCIの血液バイオマーカー POC



## 第13期研究終了時までの研究計画

- AOP475で提案した培養神経細胞を用いたSynaptotagmin DC法を用いて、Loss of drebrinを引き起こす化合物を探索する。
- NMDA受容体活性、細胞内カルシウム上昇との関係性の有無を検証する。
- カルシウム依存性酵素の活性化と、ドレブリンの移動と細胞死の関係について検証する。
- 学習記憶障害をもたらす既知化合物により、ドレブリンの分解は亢進するか、ウェスタンブロット法、ならびにSyncheck™により確認する。
- ヒト外挿性についてのヒトiPS細胞由来神経細胞の利用に関する検討を行う。