

第13期終了課題

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

本研究の成果まとめ

【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。

【研究成果】

1. AOP475wikiへの情報入力

- コーチングを受けて、AOP475の提案内容修正や記載内容に関する指導を受けた。
- 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wikiへの記載を順次行った。
- 新規キーイベントの記載、キーイベント間をつなぐ科学的根拠の文献収集、実験の実施などを行った。

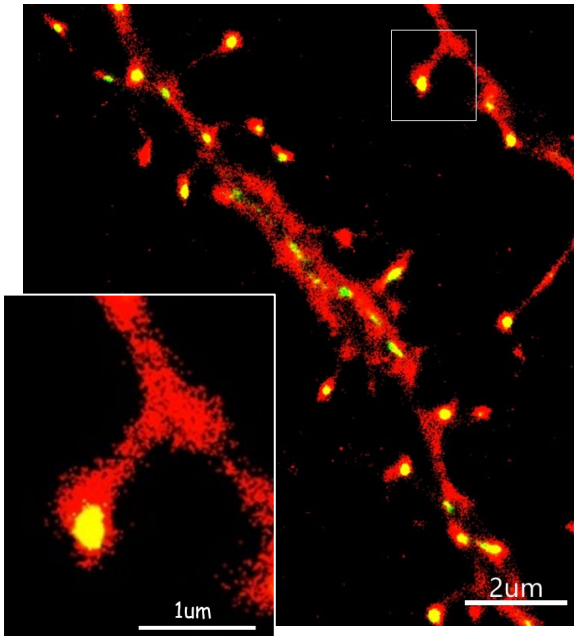
2. 化合物の毒性試験

- 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を

神経毒性/発達神経毒性: 学習記憶メカニズムとLoss of drebrinによる記憶障害のメカニズム

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

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。



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)

活動依存性的
動態とスパイン
形態安定化



定常状態

●ドレブリン

ドレブリンが恒常的に
生成・維持されている

シナプス入力

ドレブリンが樹状突起
幹に移動する

シナプス形態変化

細胞骨格の固定が解除
され、スパインが肥大

記憶固定

スパインにドレブリン
が戻り、形状の再固定

記憶維持

記憶の固定が
起こらない



ドレブリンが減少

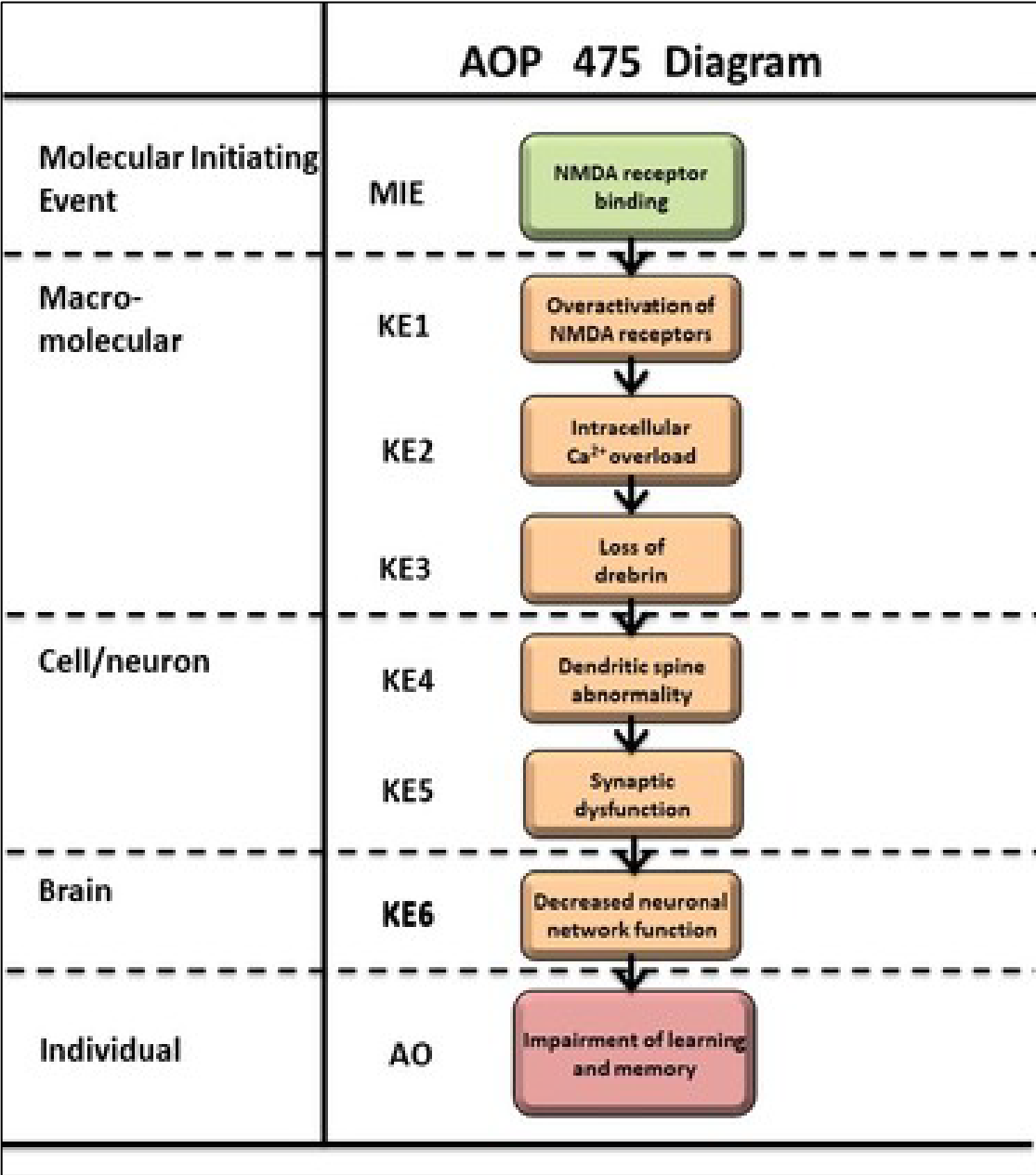
ドレブリンの分解によ
り細胞骨格の固定解除

ドレブリン欠如で固定
されず、スパイン退縮

忘却

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

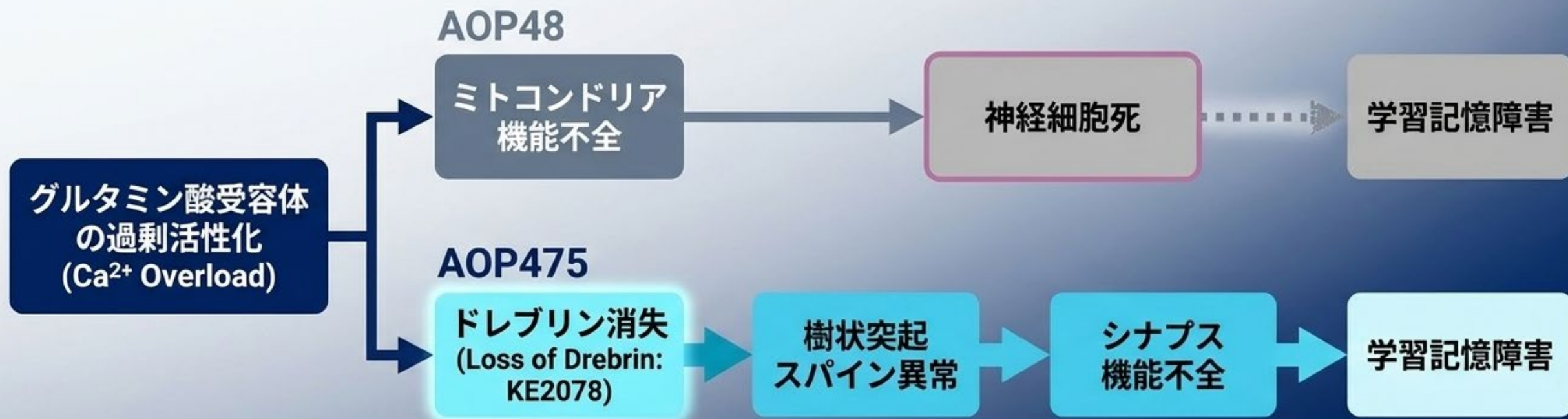
AOP475のストラクチャー



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

学習記憶障害に至る新たな経路の提唱

Proposing a New Pathway to Learning and Memory Impairment

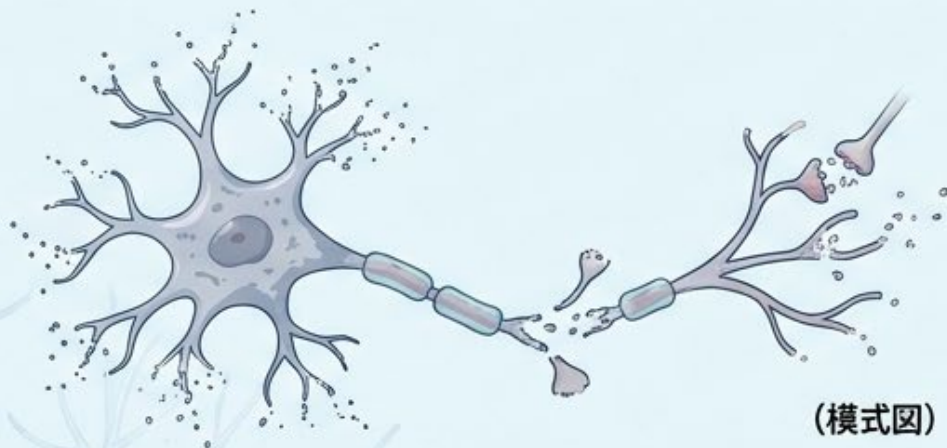


神経細胞死を経由せず、シナプス機能不全から直接的に学習記憶障害に至る新たなパラダイム

なぜドレブリンをターゲットにして測定すると良いのか / Why Target Drebrin?

従来のアプローチ: 神経細胞死

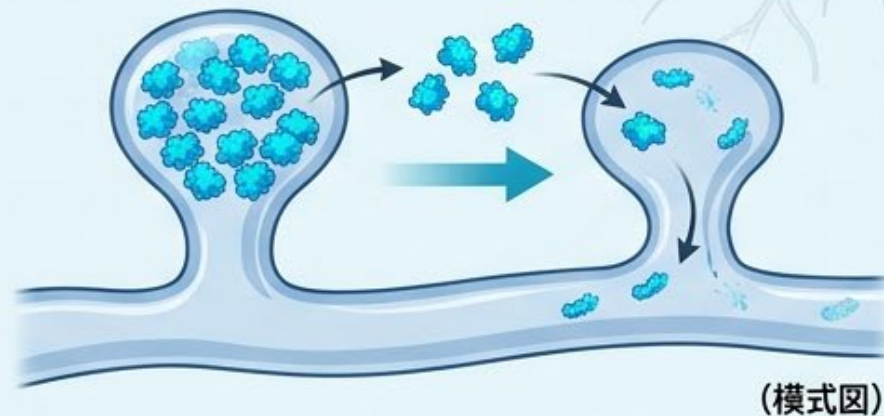
最終的な破綻を待つ評価



従来の毒性指標（AOP48など）は神経細胞死をエンドポイントとする。しかし、細胞死が起こる前にすでにネットワークの破綻は始まっている。

新規アプローチ: ドレブリン消失

早期シナプス機能不全の直接評価



- ドレブリンは樹状突起スパインに局在するアクチン結合タンパク質であり、学習記憶の基本素子である。
- 神経細胞が死に至るより「前」に、ドレブリンがスパインから消失（エクソダス）し、シナプス機能不全を引き起こす。
- ドレブリンの量と局在を測定することで、細胞死非依存的な機能的シナプス毒性を高感度に捉えることが可能となる。

パラダイムシフト：細胞死からシナプス機能不全へ

従来の神経毒性試験は「細胞死」を指標としてきましたが、近年の研究により、学習・記憶障害は細胞死を伴わない「シナプス機能不全」でも生じることが明らかになっています。

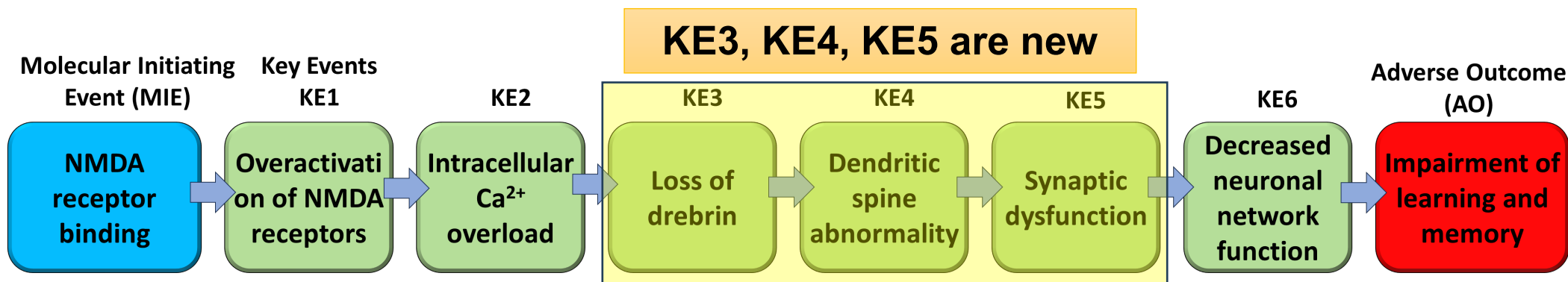
比較項目	従来の毒性評価モデル	本研究が提案する新しいNAM
主要な指標	神経細胞死・組織の炎症	<u>シナプス可塑性の構造的変化（ドレブリン）</u>
評価レベル	個体行動・組織病理（マクロ）	→ <u>分子・細胞レベル（ミクロ・定量的）</u>
試験期間・コスト	長期間（動物の成熟を待つ）・高コスト	 <u>短期間（in vitro）・低コスト</u>
ヒト外挿性	種差の壁が大きく不確実性が残る	 XEQU-AVSC ESER-GBGC <u>アミノ酸配列が高度に保存・iPS細胞活用で高い</u>
動物福祉（3Rs）	動物実験に大きく依存	 <u>動物実験を代替・補完（3Rs推進）</u>

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

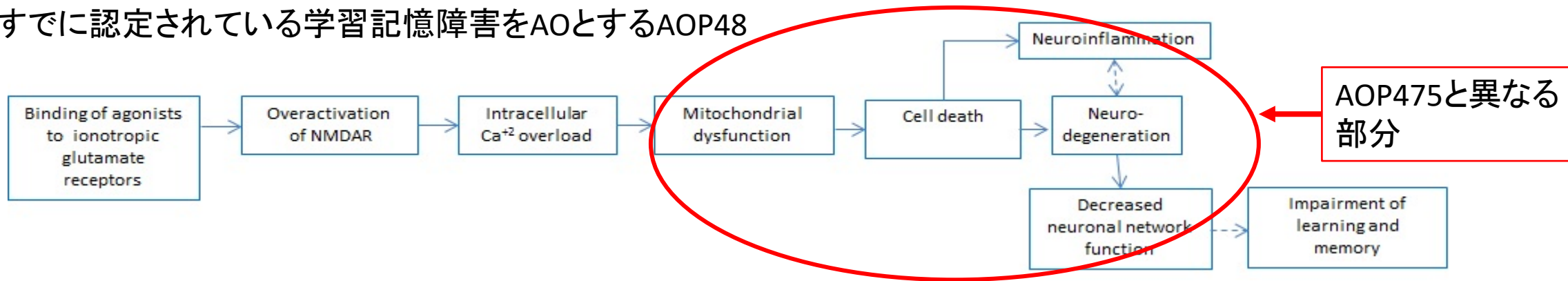
Overactivation of NMDAR induced “loss of drebrin” is directly related to “synaptic dysfunction” which leads to the impairment of learning and memory

現在登録されているAOP475



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

参考:すでに認定されている学習記憶障害をAOとするAOP48



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.

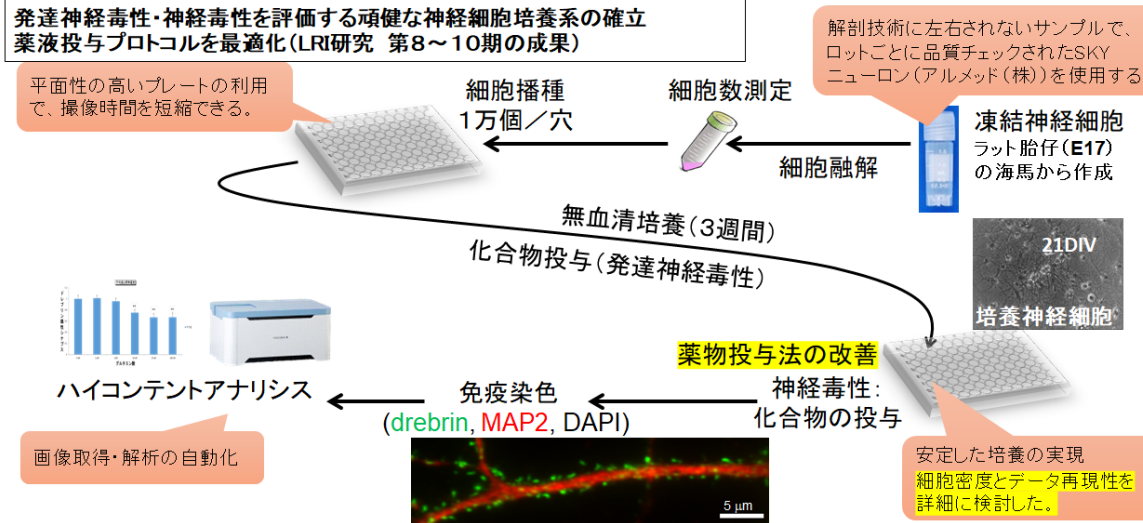
For enzyme-linked immunoassay, after the incubation of chemicals the extracts of neurons were quantified using ELISA kit for drebrin (ALzMEd, Inc.),

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).

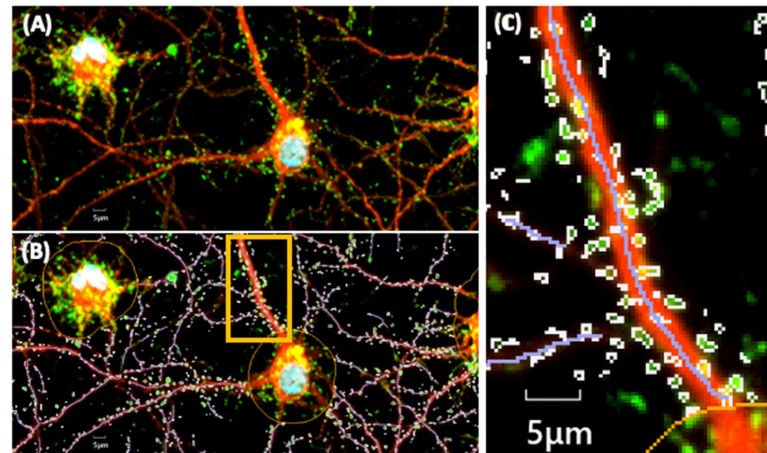
Loss of drebrin (KE3) の計測法

細胞免疫染色 Synaptotagmin 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



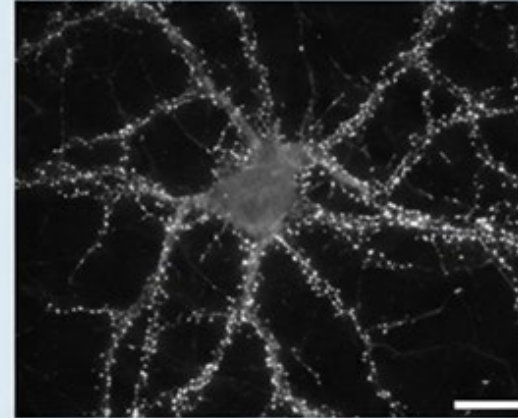
B. 3週間培養後のドレブリンクラスタ数の自動測定法



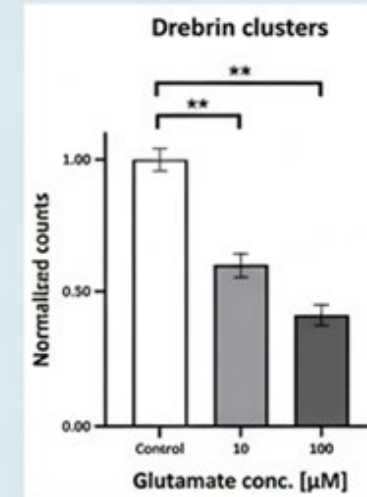
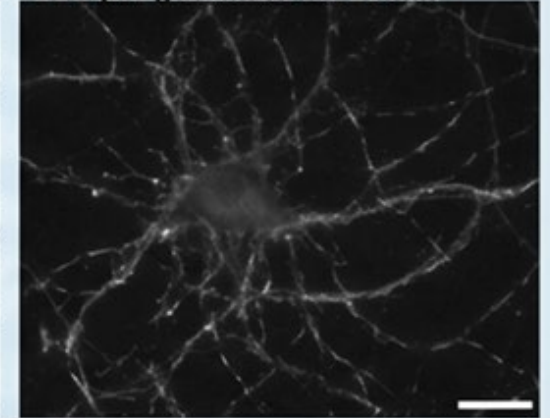
CQ1による撮影とセルパスファインダー解析

Immunocytochemistry of drebrin

Control



100 μ M glutamate for 10 min



グルタミン酸投与によるドレブリンクラスタ数の有意な減少 (ドレブリン消失)。

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

Loss of drebrin leads to Dendritic spine abnormality

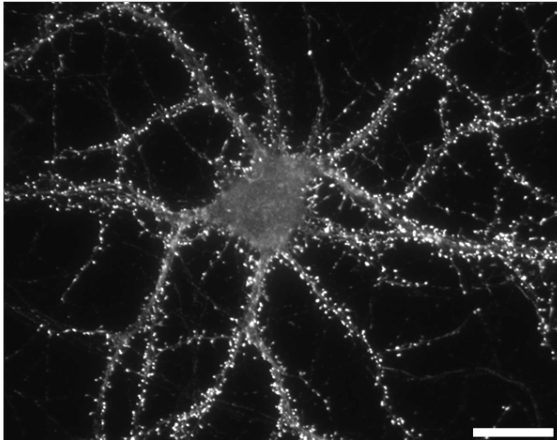
Key Event Relationship Description

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.

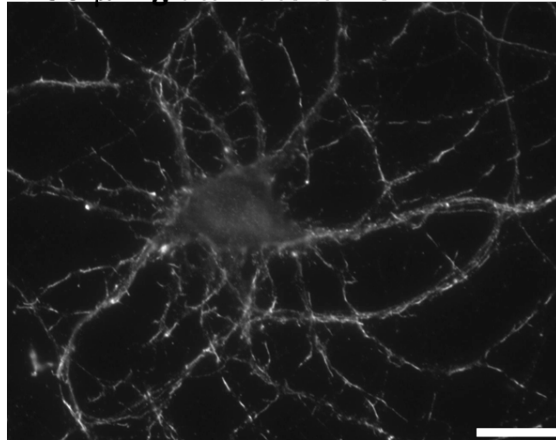
Loss of drebrin

Immunocytochemistry of drebrin

Control



100 μ M glutamate for 10 min

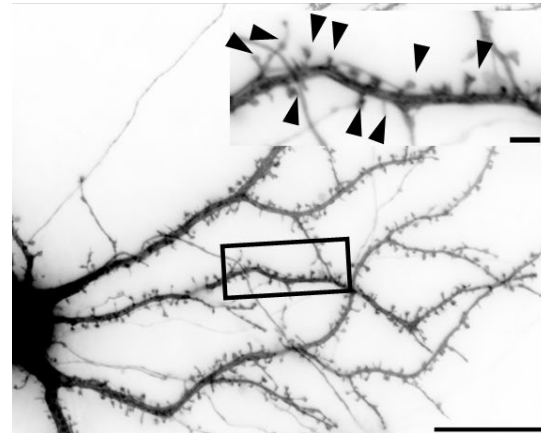


培養海馬神経細胞にグルタミン酸を投与すると、drebrinエクソダスがおこり、樹状突起スパイン内からdrebrinが消失する。
ドット状のdrebrinクラスターが消失している。

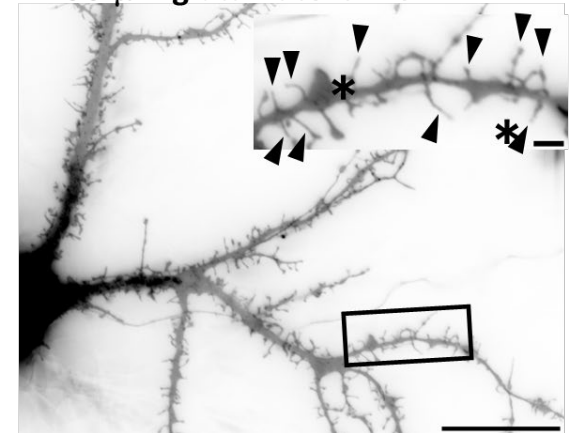
Dendritic spine abnormality

Phalloidin staining

Control



100 μ 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



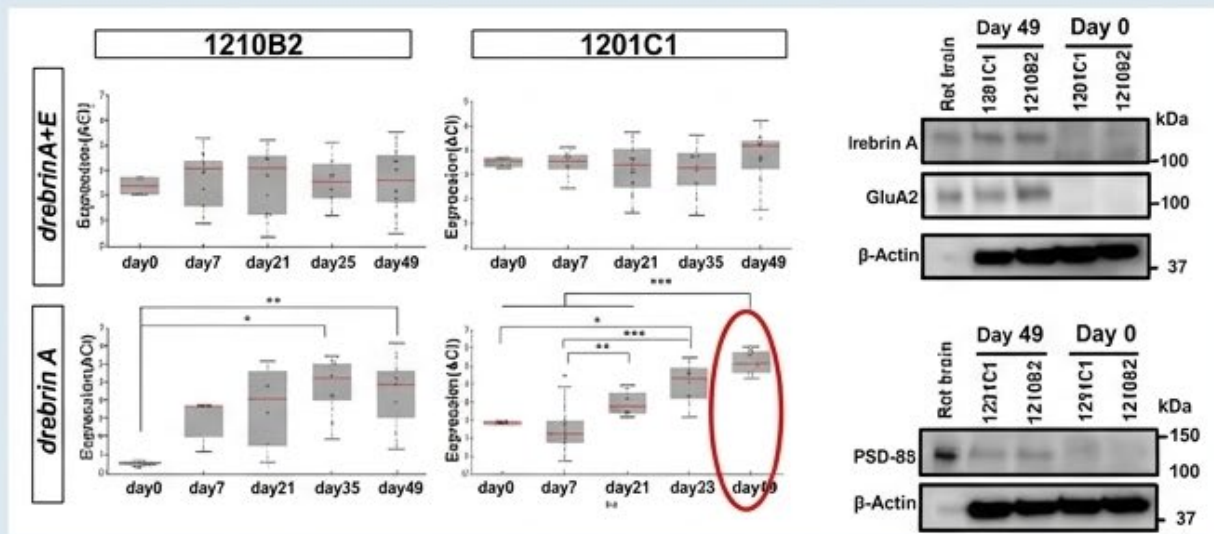
Figure 1. Dendritic spine abnormalities in Patau syndrome and DS. Drawings are from Golgi preparations depicting comparable segments of apical dendrites from layer V pyramidal neurons (motor cortex). (A-E) Different developmental stages in normal subjects (5th gestational month, 7th gestational month, 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

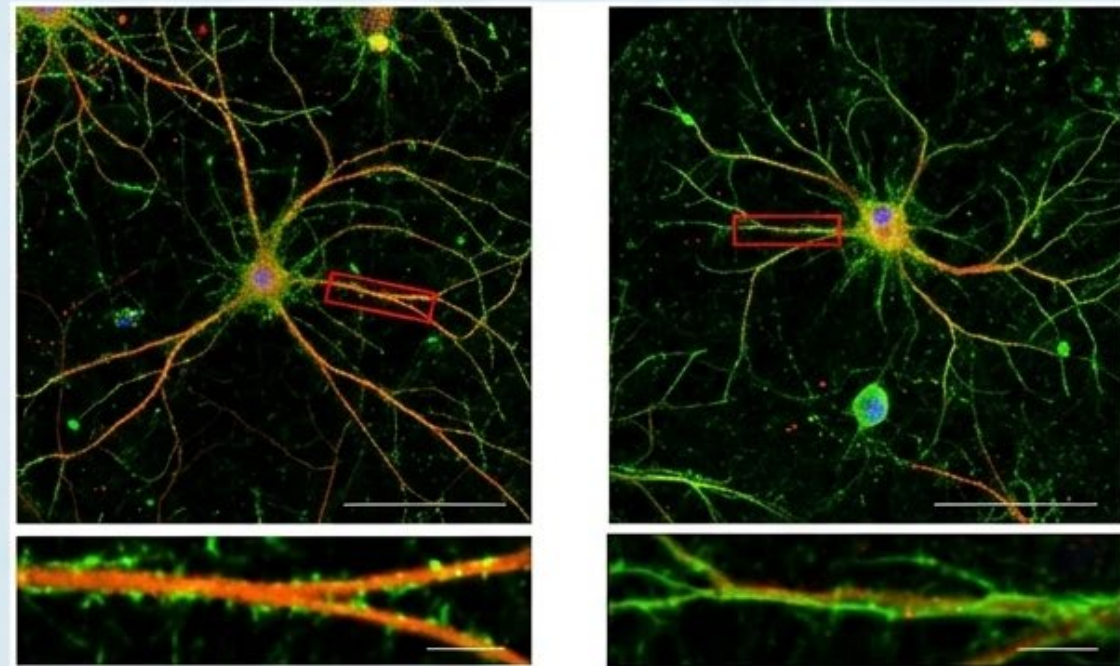
計測データのヒト外挿性の検証① (ヒトiPS細胞)



【エビデンス 1】 ヒトiPS細胞由来神経細胞の成熟過程において、げっ歯類と同様にdrebrinのアイソフォーム変換（EからAへ）が起こる。

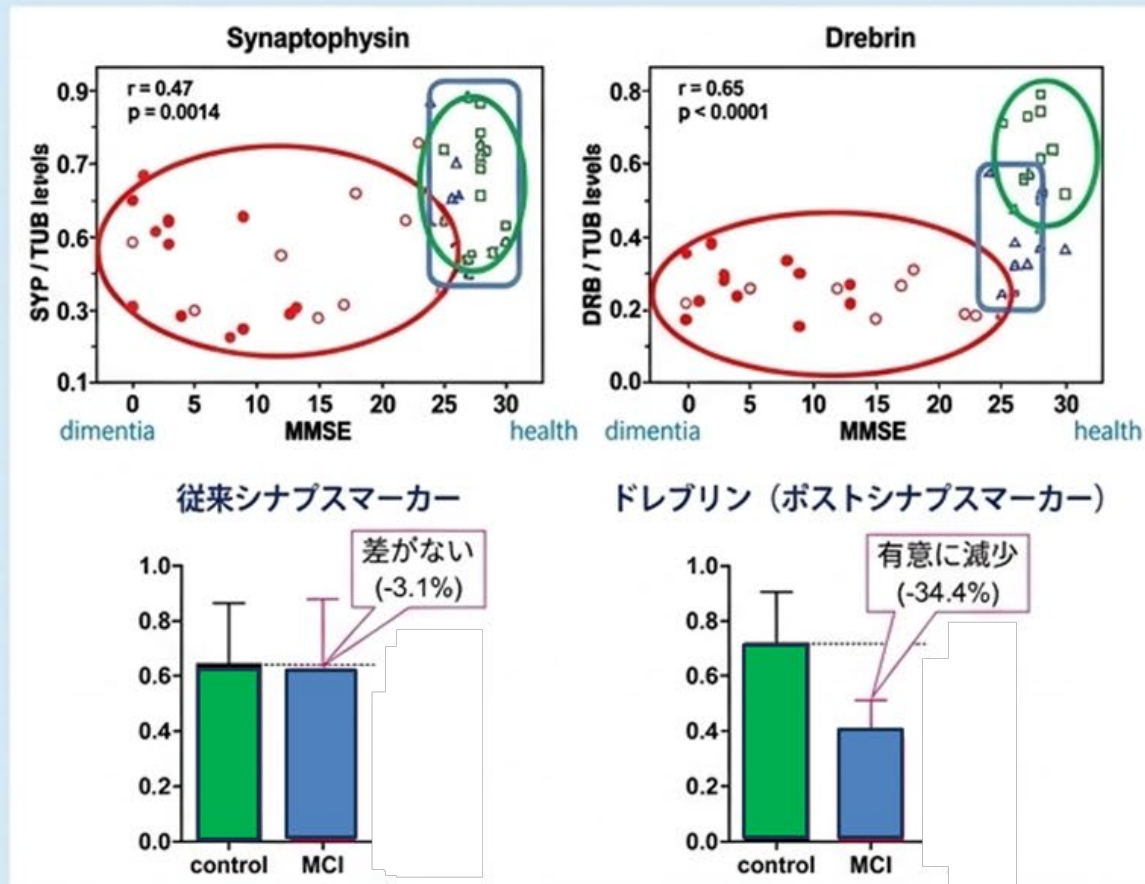
0 μ M glutamate

100 μ M glutamate (10 min)



【エビデンス 2】 成熟したヒト細胞でも、ラット細胞と全く同様に、グルタミン酸刺激により樹状突起スパインからdrebrinが消失（エクソダス）する現象を確認。

ヒトデータへの外挿性検証② (臨床データとSyncheck)

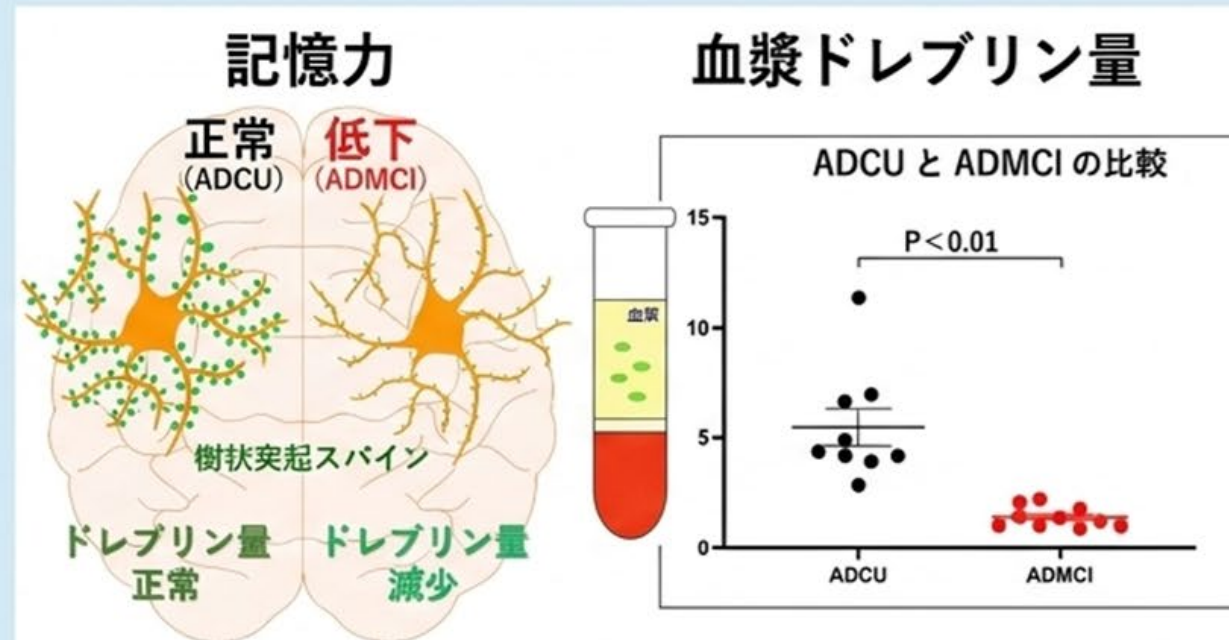


従来マーカー（シナプトフィジン）では差が出ないMCI（早期）において、ポストシナプスマーカーであるドレブリンは有意に減少する。

Counts SE et al. 2006, 2012 より改変

[血液で認知機能を測るードレブリン測定によるアルツハイマー病MCIの早期診断ー | 東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部](https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20260107-1.html)

https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20260107-1.html



「Syncheck」による臨床応用の可能性。
脳内のドレブリン減少は血漿中で測定可能であり、
シナプス機能不全のサロゲートマーカーとして機能する。

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。

ラット胎仔由来海馬神経培養を用いて行った実験と *Synaptotagmin* DC法解析のまとめ

19薬物・実験136件の結果、樹状突起スパインからのドレブリン消失を起こす化合物はグルタミン酸受容体作動薬と細胞内カルシウム濃度の増加であった。

● グルタミン酸受容体作動薬／Ca²⁺流入系（4薬物）

NMDA・カイニン酸受容体を介した興奮毒性、Ca²⁺過剰流入モデル

glutamate	22 件
Kainate（カイニン酸）	18 件
NMDA	16 件
A23187（Ca ²⁺ ionophore）	2 件
合計	58 件

まとめ

全19薬物・136実験のうち、グルタミン酸受容体作動薬／Ca²⁺流入系4薬物で58件、その他15薬物で78件の実験を実施した。左群はドレブリンexodusの陽性率が高く、右群は薬理学的に多様な作用機序をカバーし、本アッセイの機序特異性を検証する対照群として機能している。

● その他の作用機序（15薬物）

ミトコンドリア毒、ACh受容体系、抗がん剤、除草剤、内分泌かく乱物質など

cisplatin（シスプラチン）	16 件
Rotenone（ロテノン）	14 件
Scopolamine（スコポラミン）	10 件
BTP2	8 件
pilocarpine（ピロカルピン）	6 件
Theophylline（テオフィリン）	6 件
Gluphosinate（グルホシネート）	5 件
Acetaminophen（アセトアミノフェン）	3 件
cycloserine	2 件
Methotrexate（メトトレキサート）	2 件
Amantadine（アマンタジン）	2 件
vanadate（バナジン酸塩）	1 件
MPTP	1 件
bisphenol A（ビスフェノールA）	1 件
7-dehydrocholesterol	1 件
合計	78 件

まとめと今後の展望

- AOP 475の構築: 動物実験に依存しない、新たな毒性評価フレームワークを確立した。
- 新規ツールの実装: 「Synaptox DC法」により、in vitro環境で化学物質の神経毒性リスクをハイスループットかつ定量的に評価可能となった。
- ヒト外挿性の証明: ラット細胞での知見はヒトiPS細胞で完全に再現された。
- 臨床データとのリンク: さらに「Syncheck」により、実際のヒト臨床データ（MCI/AD患者）とリンクさせることに成功した。

結論: 本手法（NAM）は、臨床データを外挿基準とした極めて信頼性の高い「学習・記憶障害のリスク予測法」である。動物モデルからヒトベースの毒性評価への強力なパラダイムシフトを提供する。