

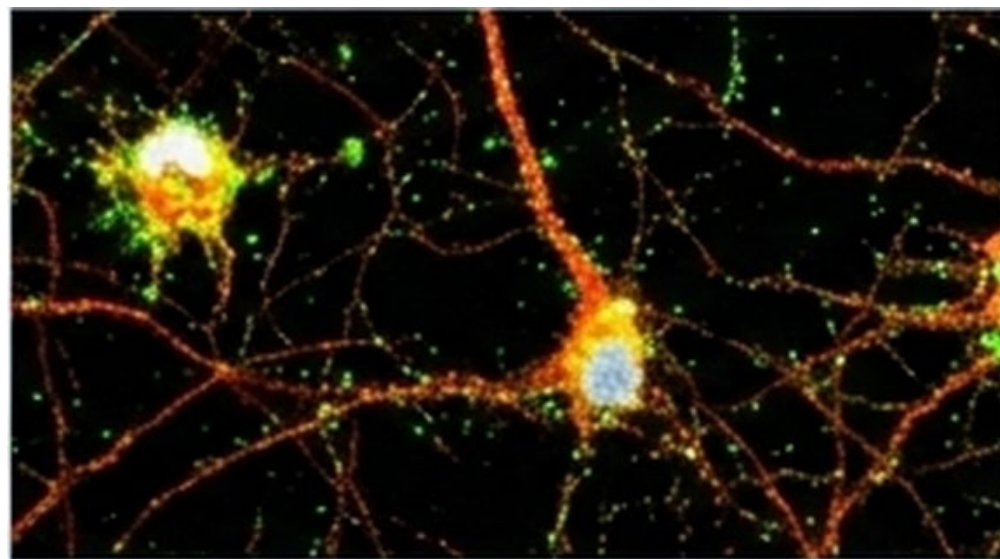
AOP475に基づく神経細胞樹状突起スパイン形態 バイオマーカー・ドレブリンを指標としたNAMの 信頼性評価およびOECD導入に向けた検証研究

— 学習・記憶障害リスク in vitro 予測法の確立を目指して —

関野 祐子

東京大学大学院農学生命科学研究科・獣医衛生学教室

2026年 LRI研究報告会
(第14期採択課題 発表2026年8月28日)



低密度培養海馬神経細胞 (21 DIV) 免疫細胞染色
(水色：細胞核 緑：ドレブリン／赤：MAP2)

導入と課題提起 | Introduction and Problem Statement

【現行法の課題】

膨大な時間とコスト

動物実験（OECD TG424/426）
への依存

⚠ 最大の課題：低いヒト外挿性

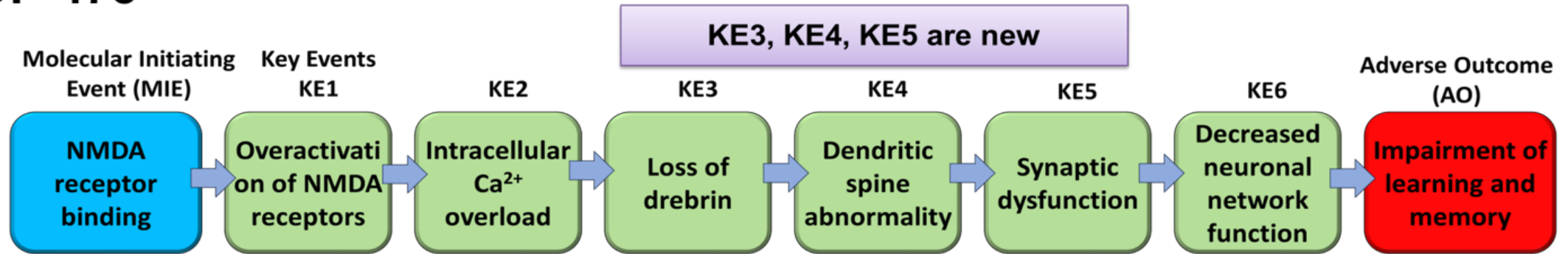
【解決策へのアプローチ】

- in vitro環境での新たな毒性評価
フレームワーク（NAMs）の開発
- AOP（有害性発現経路）に基づく
予測手法の確立

化学物質の学習・記憶に対する影響は、動物実験代替法での評価が極めて困難とされてきた。我々は、シナプス機能を直接評価することで、ヒトへの高い外挿性を持つ神経毒性・発達神経毒性評価のパラダイムシフトを目指す。

神経毒性・発達神経毒性(学習・記憶障害)のAOP

AOP 475



AOP-Wiki (<https://aopwiki.org/aops/475>)に搭載されているそれぞれのイベントID

MIE875

KE388

KE389

KE2078

KE2242

KE1944

KE386

AO341

各Key Event (KE)の定義とそれぞれの関係(KER)について論文エビデンスが掲載されている。

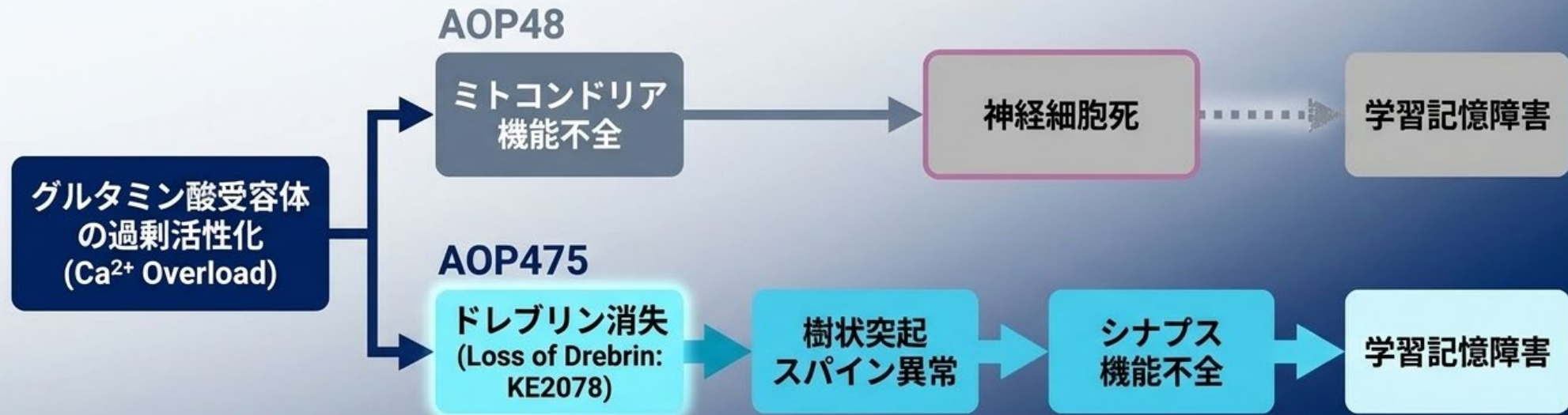
「ドレブリン減少 Loss of drebrin」(KE2078)を学習記憶障害(AO341)の新しいキーイベントとして提案

神経細胞死がなくても、樹状突起スパイン数の減少や形態異常で学習記憶障害がおきる。
樹状突起スパインの形成・維持・可塑性はアクチン細胞骨格ドレブリン発現に依存している。
ドレブリンは、樹状突起スパイン数を反映する、ヒト外挿性のバイオマーカーである。
ドレブリン発現量は免疫細胞化学やELISAで定量的に測定可能である。

新アプローチ：細胞死を伴わないシナプス機能不全を捉える

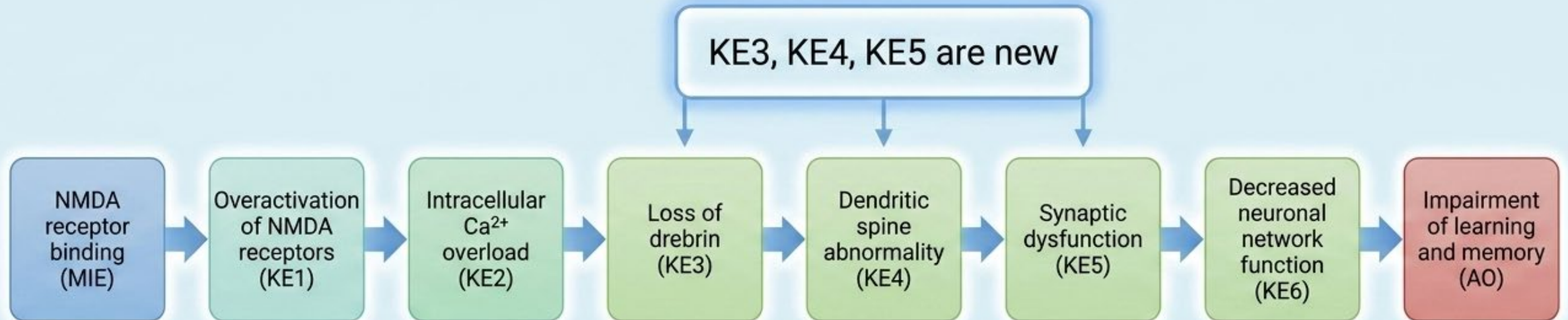
学習記憶障害に至る新たな経路の提唱

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

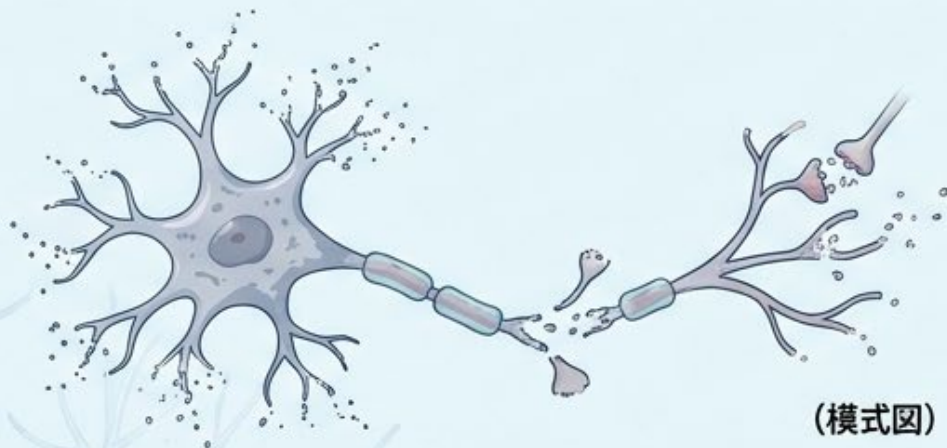
新規フレームワーク「AOP 475」の全容



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

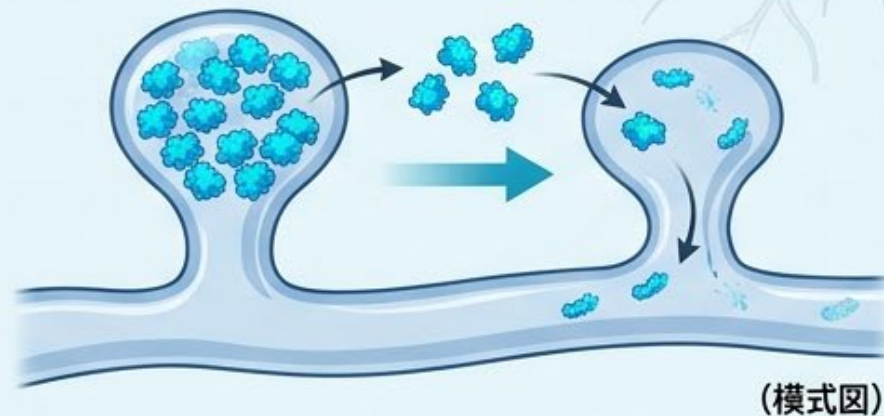
最終的な破綻を待つ評価



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



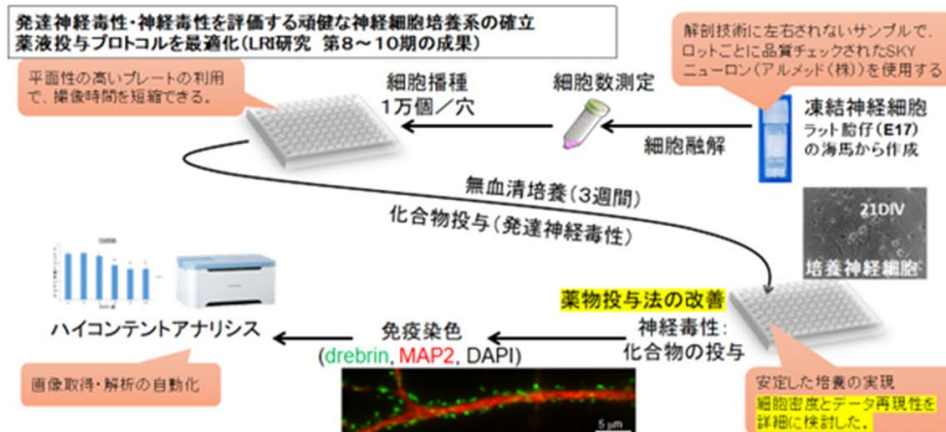
- ドレブリンは樹状突起スパインに局在するアクチン結合タンパク質であり、学習記憶の基本素子である。
- 神経細胞が死に至るより「前」に、ドレブリンがスパインから消失（エクソダス）し、シナプス機能不全を引き起こす。
- ドレブリンの量と局在を測定することで、細胞死非依存的な機能的シナプス毒性を高感度に捉えることが可能となる。

ドレブリンの定量的計測法：SynaptoxDC法とSyncheck™

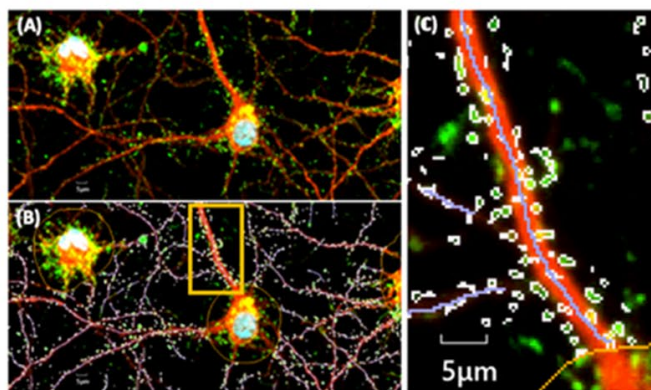
1. 培養神経細胞の免疫細胞染色でドレブリンクラスター数とクラスターの輝度分布で解析する。
2. 標本に含まれるドレブリンタンパク質をELIAS法で測定する。

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



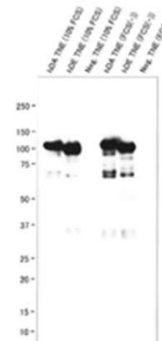
B. ドレブリンクラスター数の自動測定法 (CQ1とセルパスファインダー)



2. ELISA法による定量的解析



ELISA kit, AlzMed Inc.



hDrebrin-A ELISA kit (Antibodies AA014 and AA002)

dilution	Human drebrin A HEK lysate		Human drebrin E HEK lysate		HEK lysate	
	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		

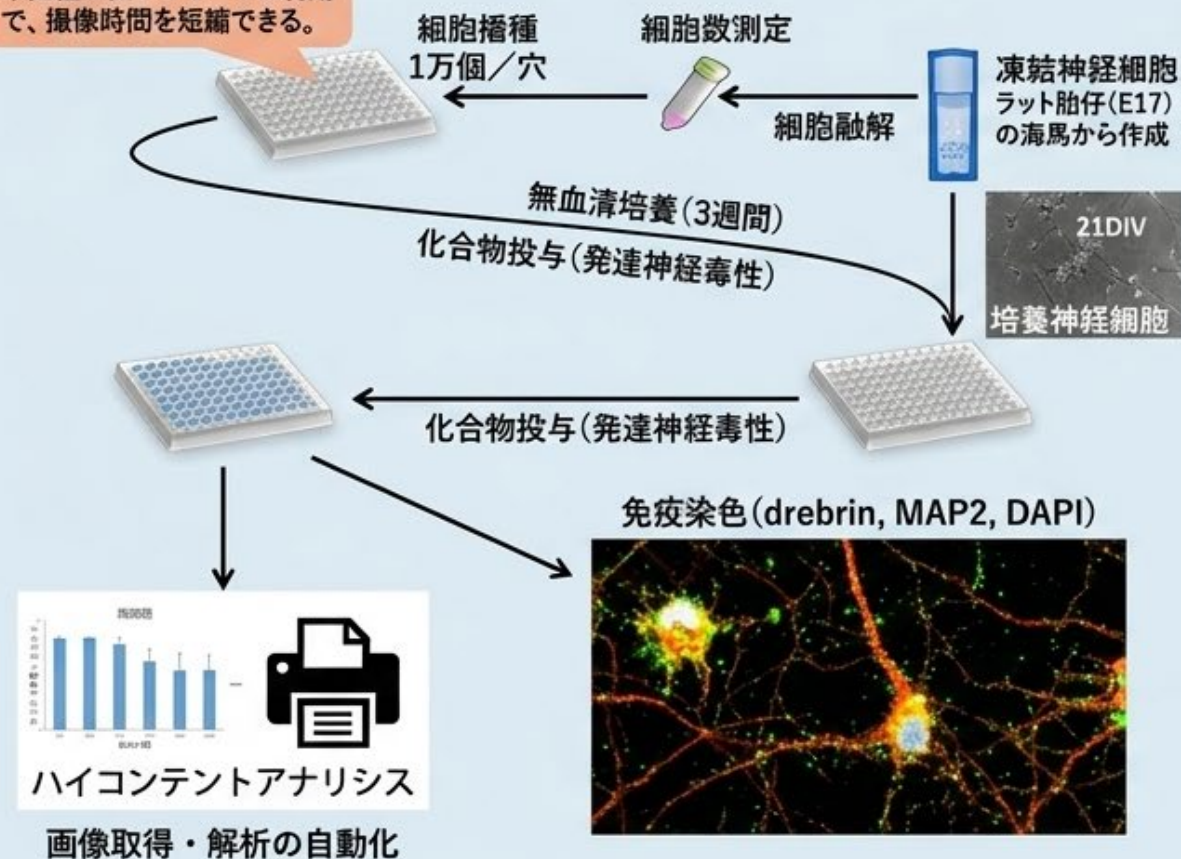
hDrebrins ELISA kit (Antibodies AA014 and AA003)

dilution	Human drebrin A HEK lysate		Human drebrin E HEK lysate		HEK lysate	
	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		

Acknowledgments: AMED (2017年～2019年度) ならびにLRI研究 (2020年～2025年度; 日本化学工業協会)

KE3計測ツール「Synaptox DC法」の開発

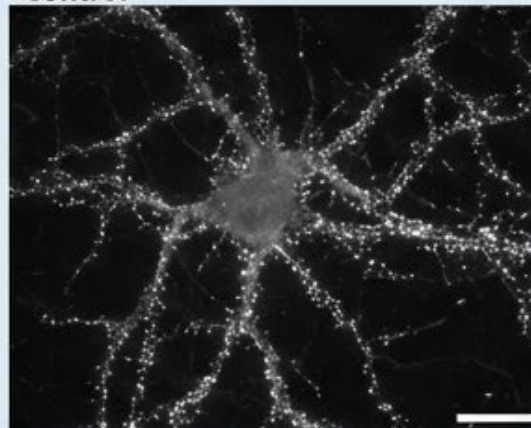
平面性の高いプレートの利用で、撮像時間を短縮できる。



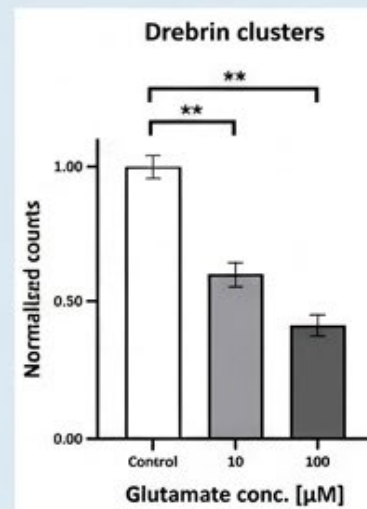
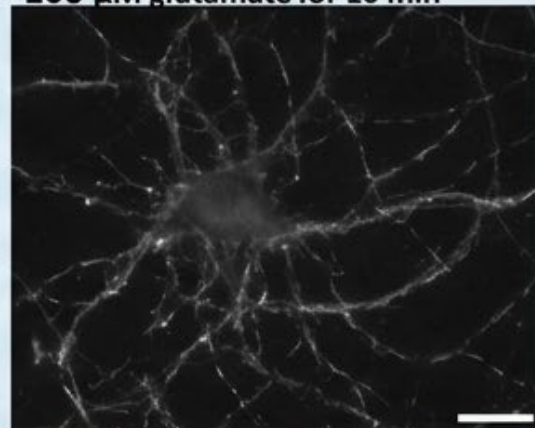
ラット胎仔由来凍結海馬神経細胞を用いた
ハイスループットアッセイ法。

Immunocytochemistry of drebrin

Control

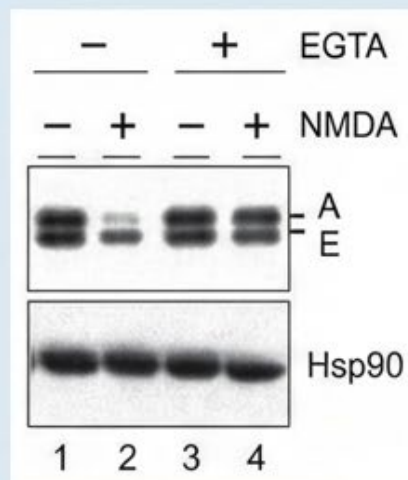
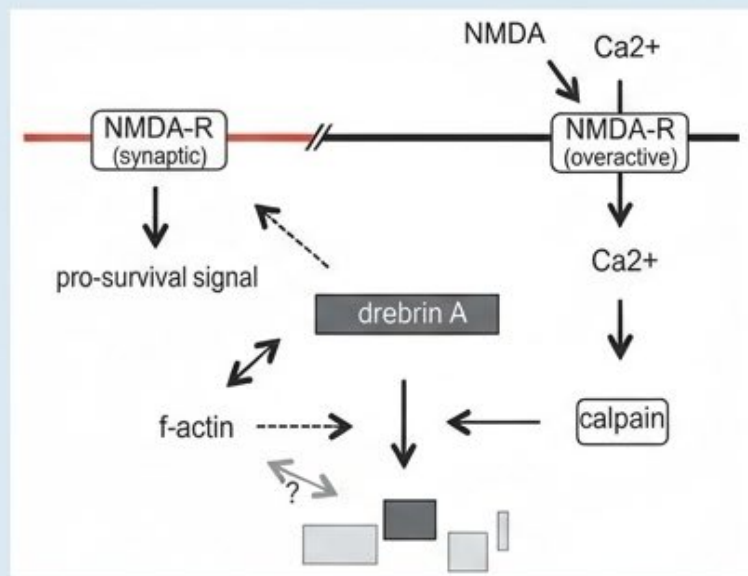


100 μ M glutamate for 10 min

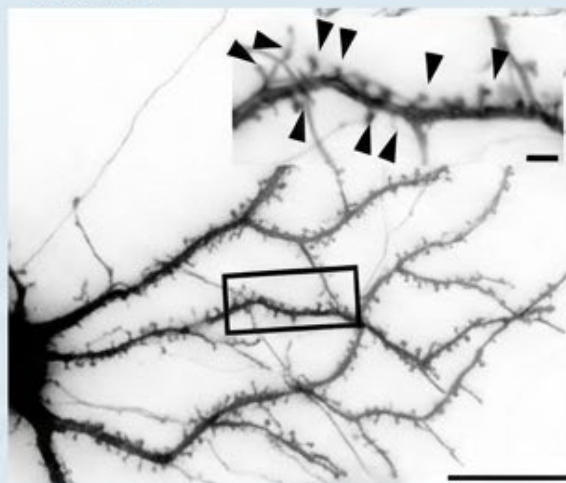


グルタミン酸投与によるドレブリンクラスター数の有意な減少（ドレブリン消失）。

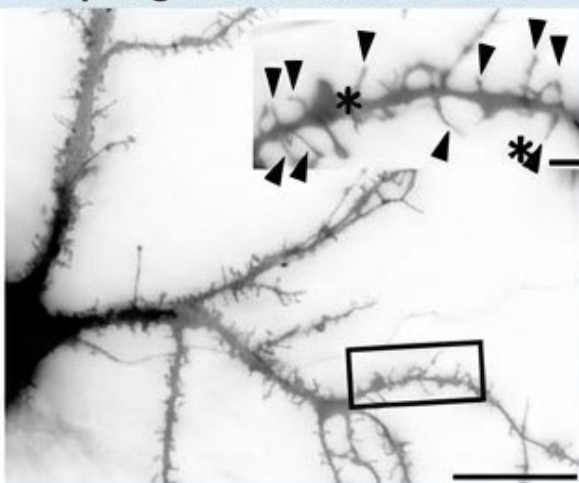
イベント間の因果関係：メカニズムの証明 (MIE $\Rightarrow$ KE3 $\Rightarrow$ KE4)



Control



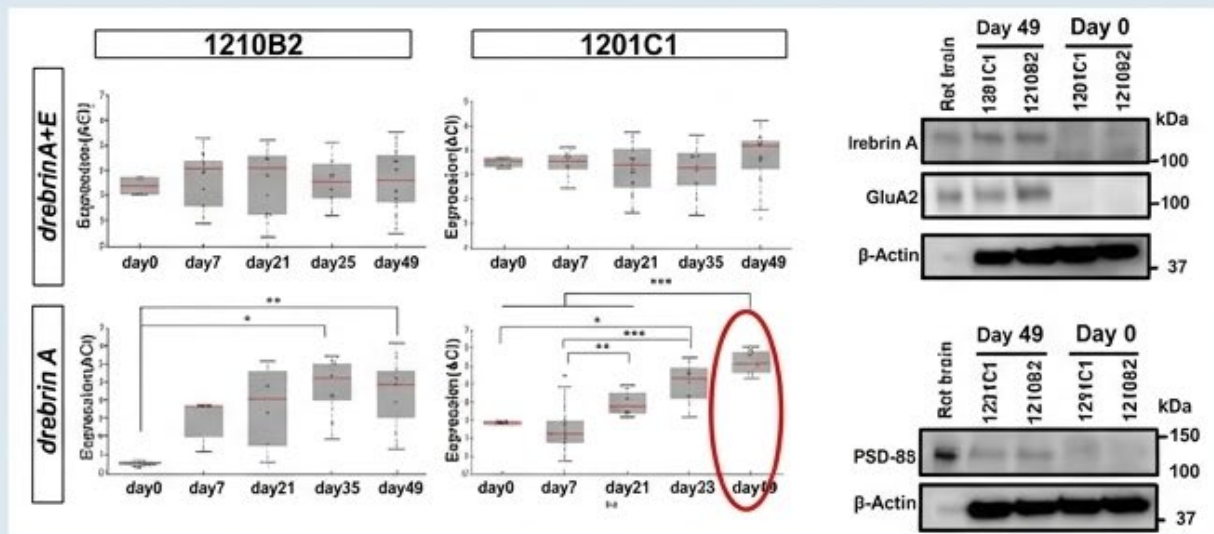
100 μ M glutamate for 10 min



NMDA受容体の過剰活性化（MIE）が細胞内Ca²⁺濃度の上昇を招き、ドレブリンの消失（KE3）を引き起こす。

ドレブリン消失に伴う樹状突起スパインの形態異常（KE4）。

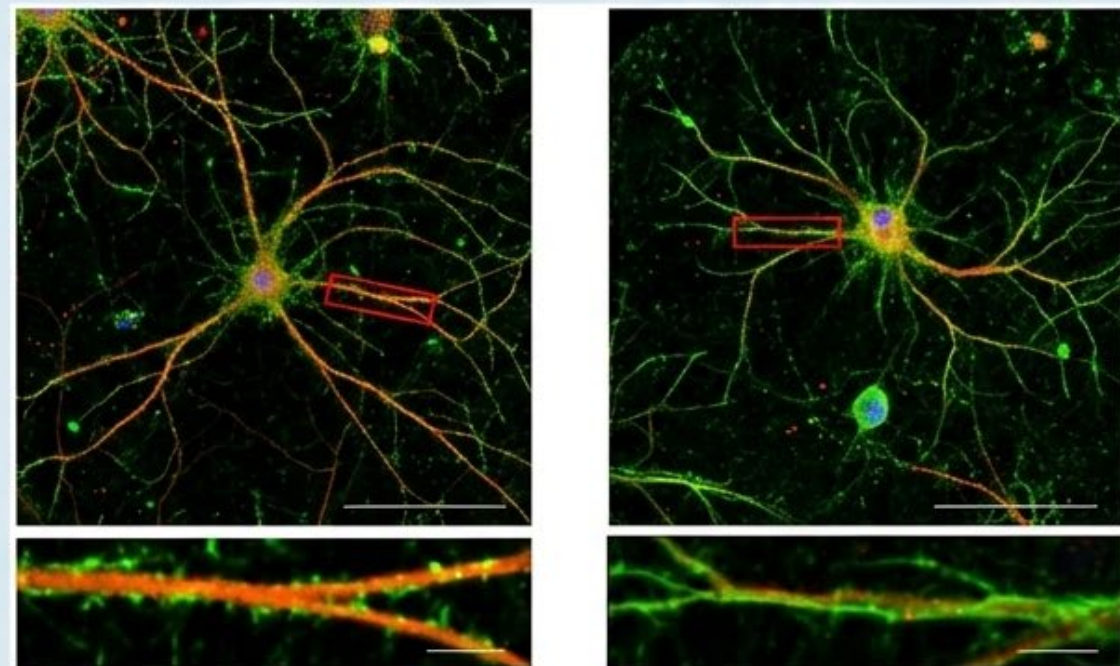
計測データのヒト外挿性の検証① (ヒトiPS細胞)



【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、げっ歯類と同様にドレブリンのアイソフォーム変換（EからAへ）が起こる。

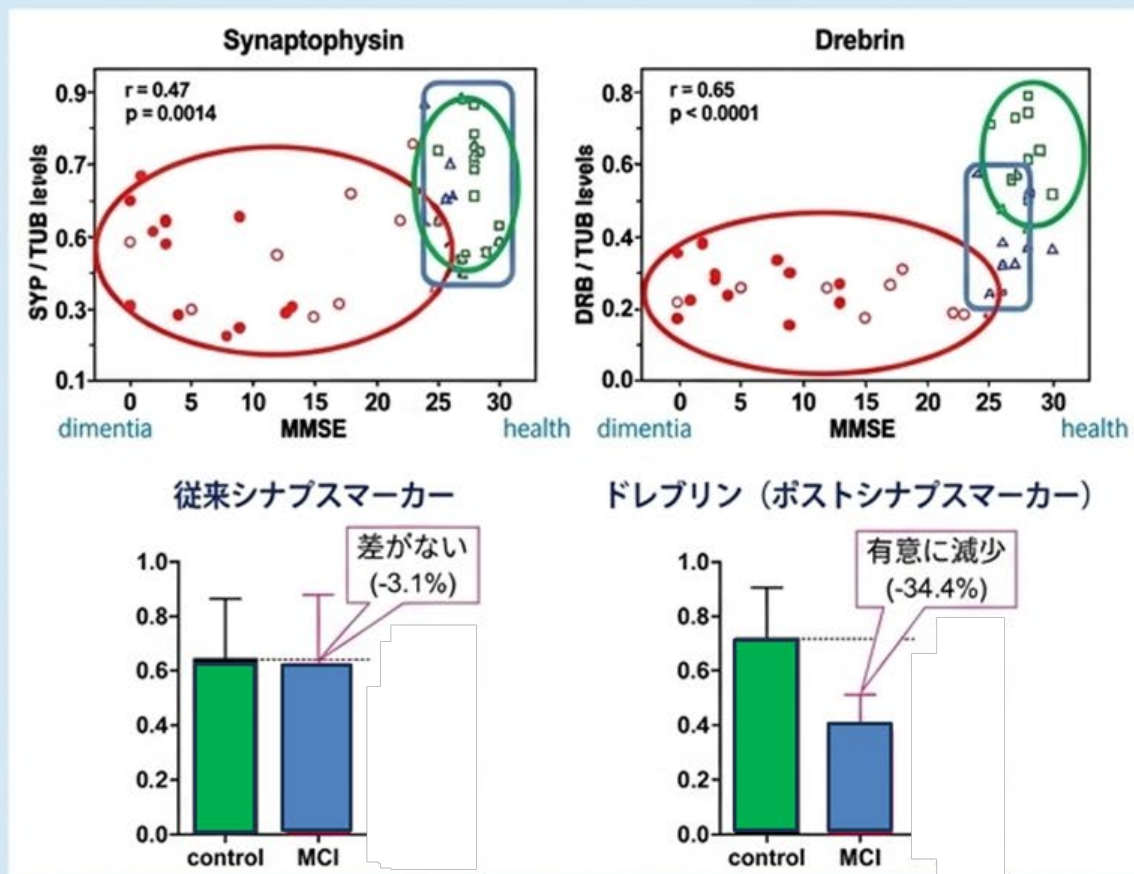
0μM glutamate

100μM glutamate (10 min)

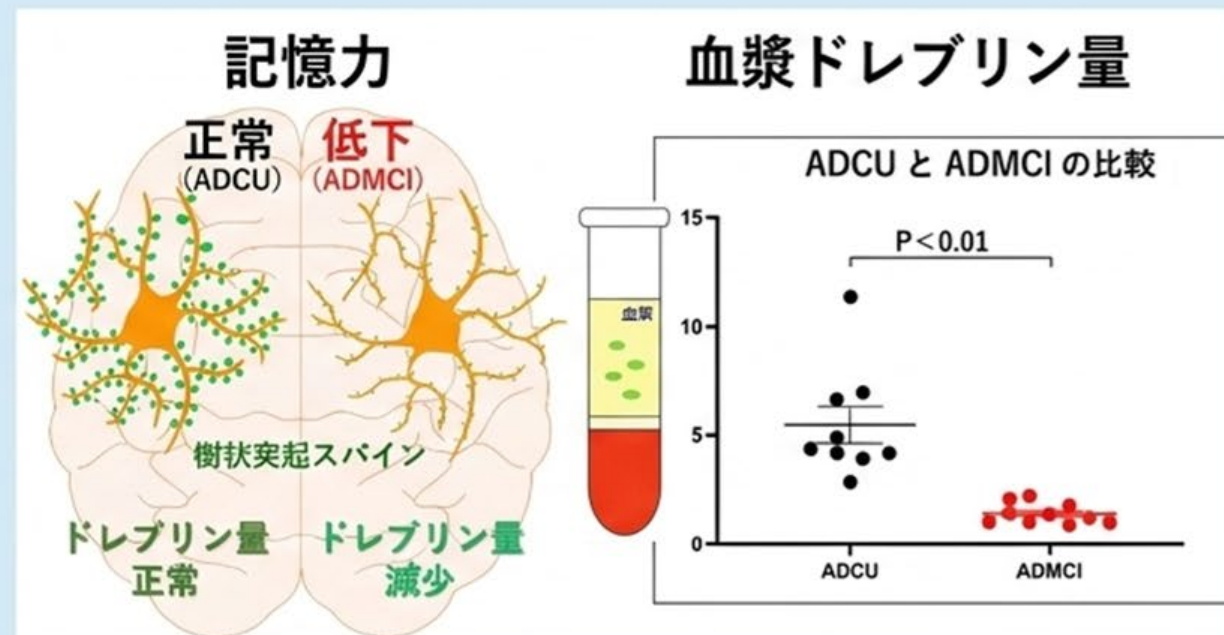


【エビデンス 2】 成熟したヒト細胞でも、ラット細胞と全く同様に、グルタミン酸刺激により樹状突起スパインからドレブリンが消失（エクソダス）する現象を確認。

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。



「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。

Shoji M et al. 2026

第14期研究課題の目標

ドレブリンを指標とする日本発NAMの国際標準化の実現と OECD TG・IATAへの展開

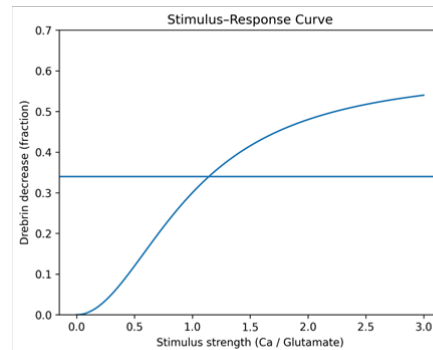
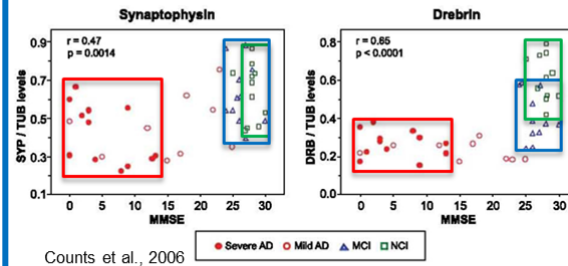
分子・細胞レベルでシ
ナプス機能障害と学
習・記憶障害リスクを
客観的に評価できる
NAMを確立



ドレブリンを指標とす
る日本発NAMの国際標
準化を実現し、OECD
TG・IATAへの展開

ヒト病態の分子変化

脳内Drebrin量は認知低下と相
関して減少
MCIで平均34%減少
ヒト外挿の基準値（アンカー）

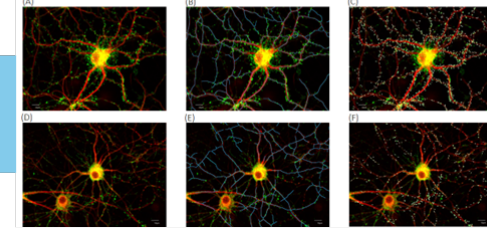


培養神経細胞：定量データ

培養海馬神経細胞免疫細胞染色

- ・ドレブリンクラスター数 (DC#)
 - ・ELISAによるドレブリンタンパク定量
- 減少率 = (対照群 - 実験群) / 対照群

ドレブリン
クラスター
の検出



刺激－反応曲線

ドレブリン減少をもたらす刺激

- ・NMDA受容体過活動で誘発される細胞内カルシウム濃度の上昇
- ・どのくらいのカルシウム濃度の上昇が、グルタミン酸刺激で誘発されるドレブリン減少と数量的に一致するのか、強さをヒルプロットで比較する。

ヒト脳で認知機能低下の引き金となる34%ドレブリン減少を引き起こす化学物質のリスクレンジを算出する

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。