

第9期採択課題

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 東京大学大学院薬学系研究科 ヒト細胞創薬寄付講座特任教授
- 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

現行の神経毒性試験法の課題

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。
- *In vitro*実験系に関しては神経細胞死を評価する方法はあるが、学習記憶に直結するシナプス機能を評価する*in vitro*実験法はまだない。

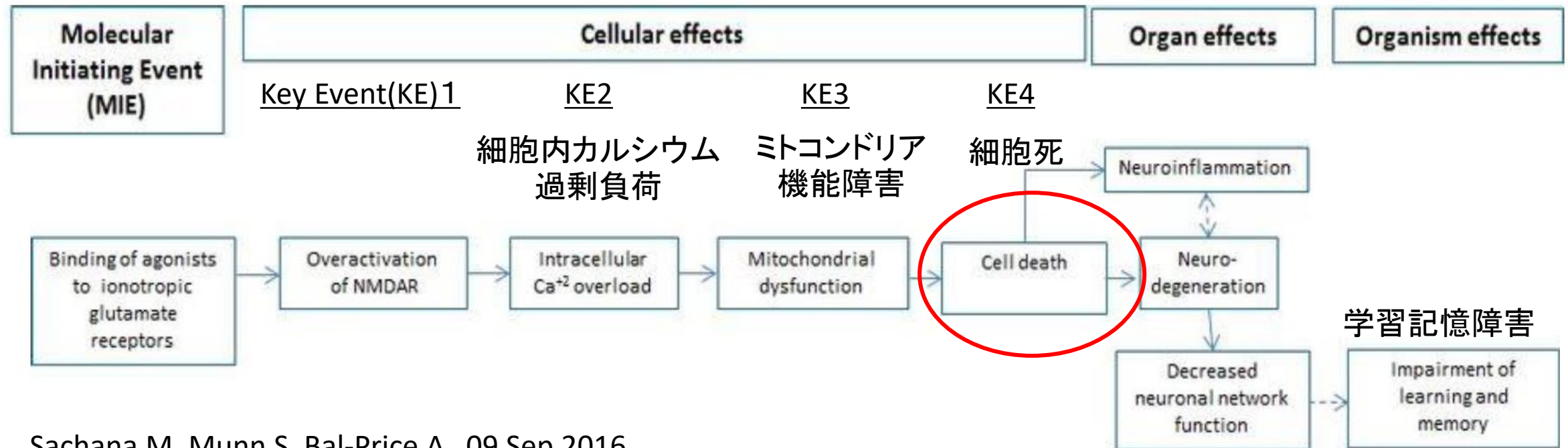
解決策

- 初代培養神経細胞やヒトiPS細胞を利用して、学習記憶メカニズムに直結するシナプス機能を評価する安価で迅速な*in vitro*試験法を開発する。

学習記憶障害をもたらす有害性発現経路(AOP)の1例

AOP: Adverse Outcome Pathway

【AOP No. 48】 Adverse Outcome Pathway on binding of agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain leading to excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment.



神経毒性の強度と障害レベル

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

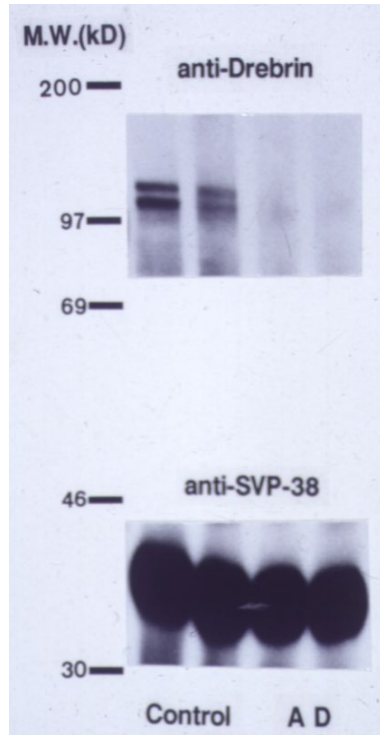
軽度

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。

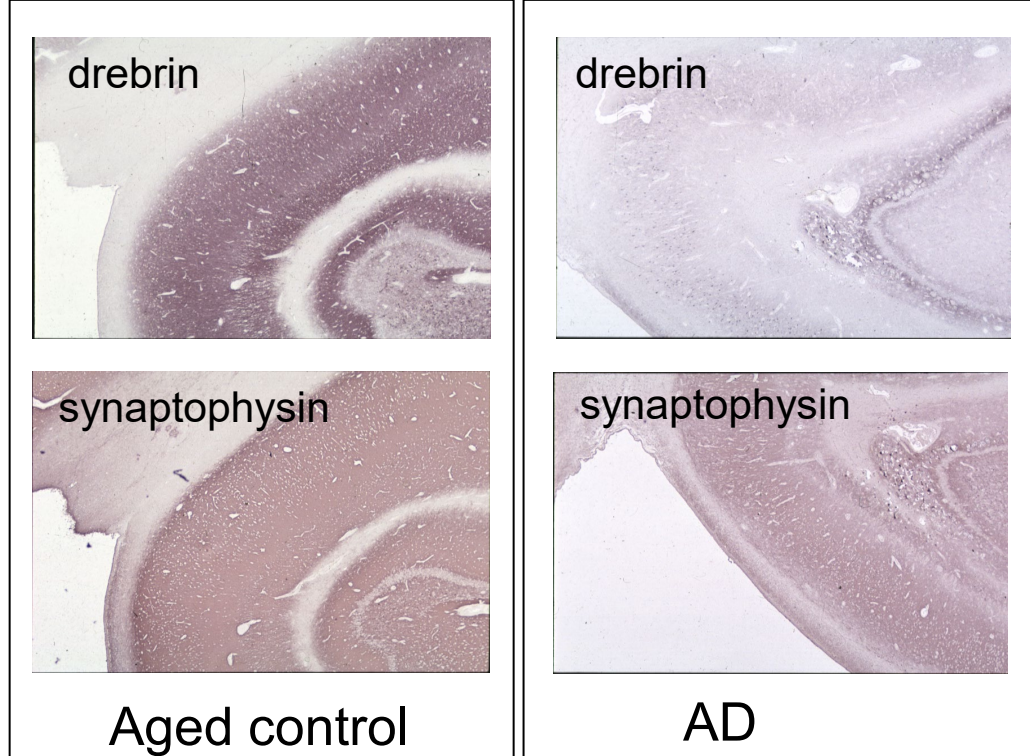
学習記憶障害と脳のアクチン結合タンパク質ドレブリンとの関係

- アルツハイマー病死後脳の研究 Harigaya et al., *J Neurosci Res* (1996)

Western Blotting



Immunohistochemistry of Hippocampus



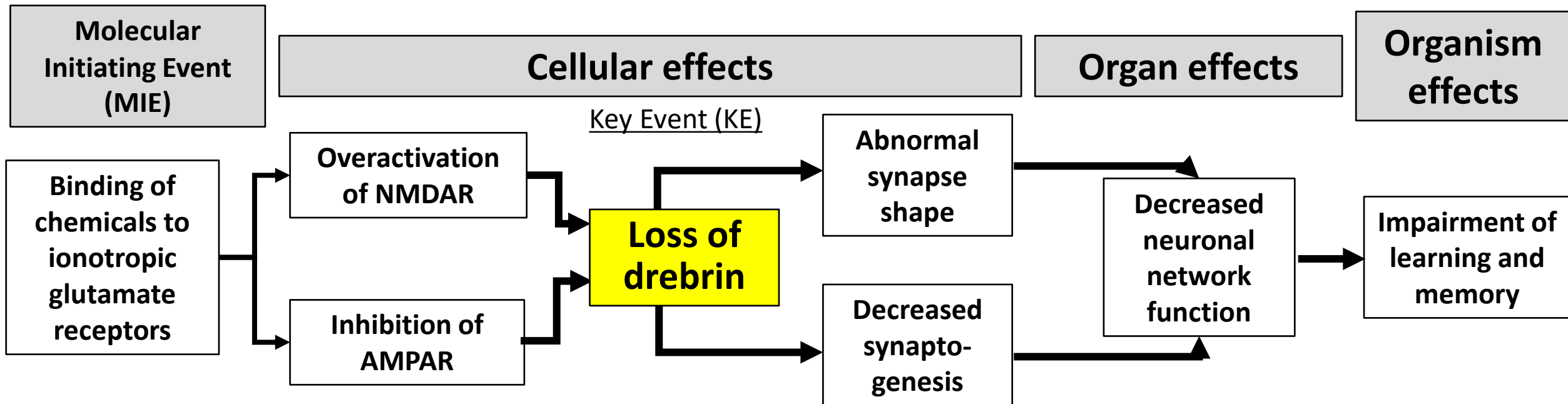
化学物質による学習記憶機能への有害反応を調べるために、免疫組織染色や免疫細胞染色などでドレブリンの減少を調べることが、時間とコストの節約になる。

- 放射線やshRNAでドレブリンを減少すると学習機能が低下する。
- ドレブリンノックアウトマウスには学習機能障害がみられる。

シナプス機能への毒性を評価するAOPの提案

学習記憶障害はシナプス機能不全(シナプス部位に起こる機能的構造的障害)で起こることから、“Loss of drebrin”をCellular effectsのKey Event (KE)とする。

MIEとして化合物のNMDA型グルタミン酸受容体への結合を挙げているAOP48, AOP13などと比較するとKEが試験法が簡素で定量性が高くなる。

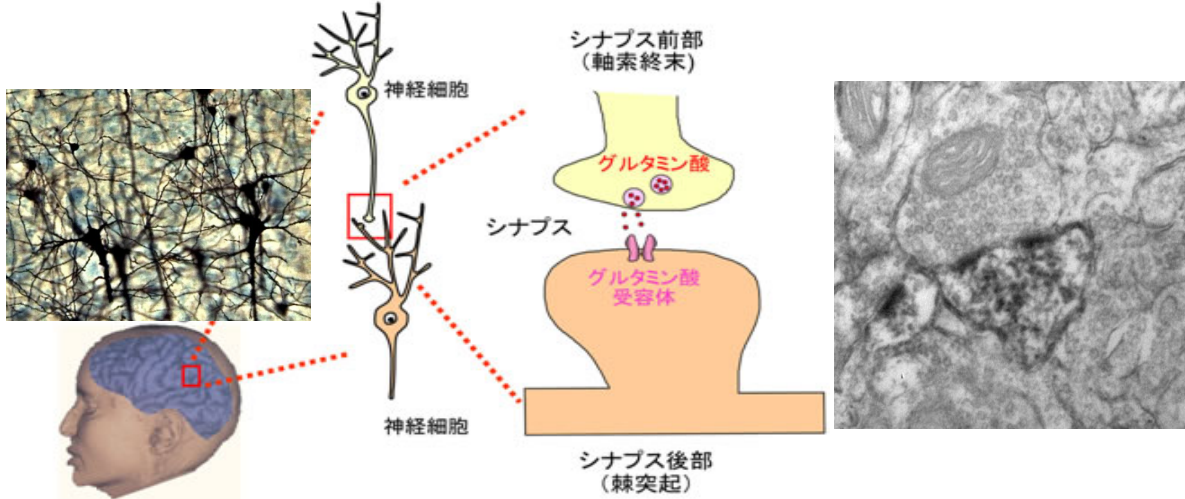


本研究の目的

- ① 神経細胞特異的アクチン結合タンパク質ドレブリンの消失をKey Event(KE)とする発達神経毒性や学習記憶障害を有害事象(AO)とする有害性発現経路(AOP)を提案する。
- ② 神経細胞のドレブリンの量と局在を定量解析するため、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。
- ③ 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。さらに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。
- ④ ヒトiPS細胞由来神経細胞を利用した実験動物を利用しない実験系の構築を目指す。

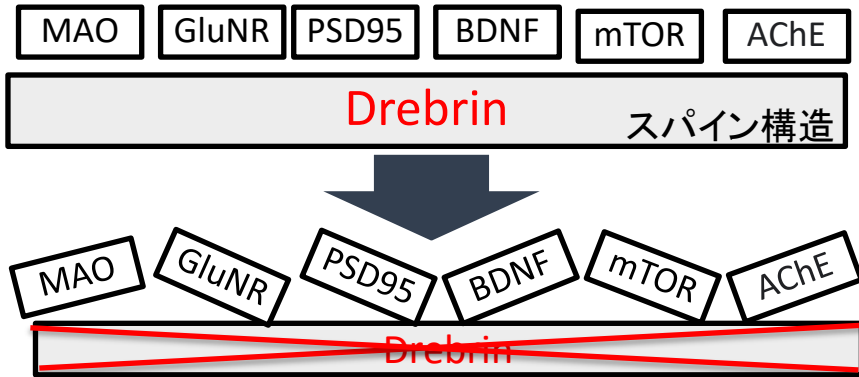
なぜドレブリン消失がKEととなるのか？

記憶学習の場である樹状突起スパインの形成と可塑性を担うタンパクである。

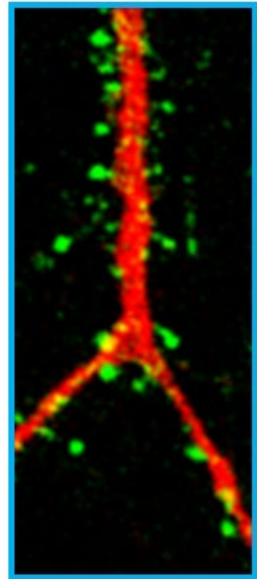
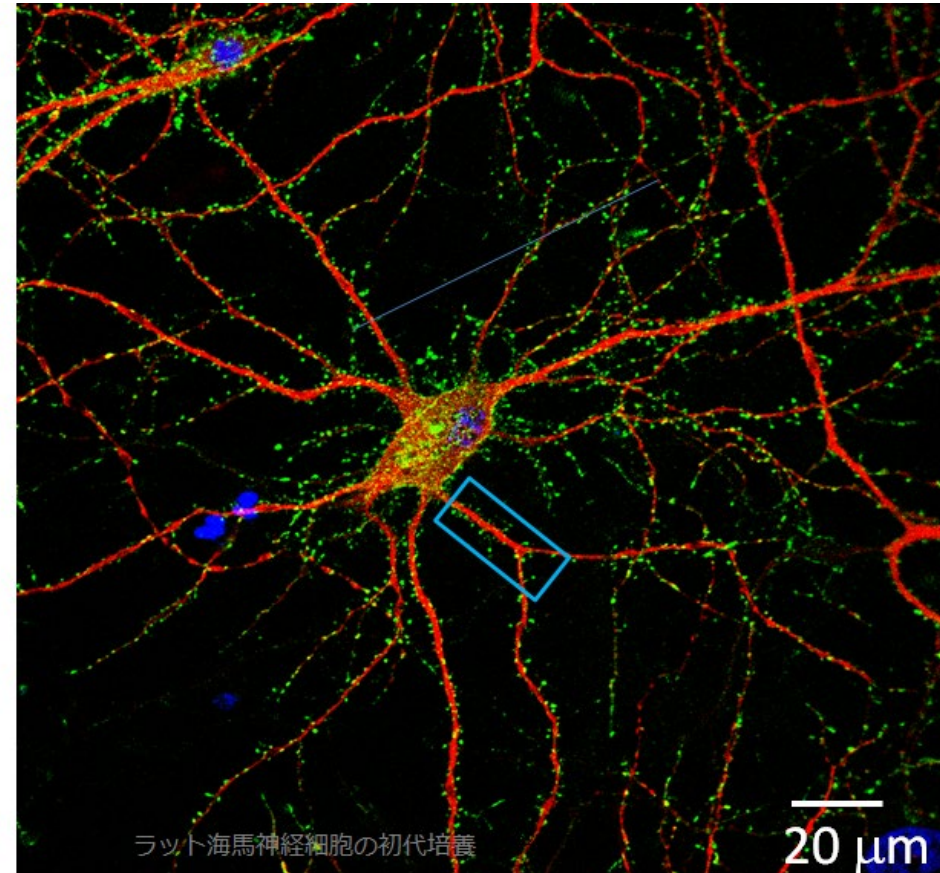


シナプス後部

シナプス機能
タンパク質群



ドレブリンは受容体などのシナプス後部の機能タンパクの局在を安定化している。



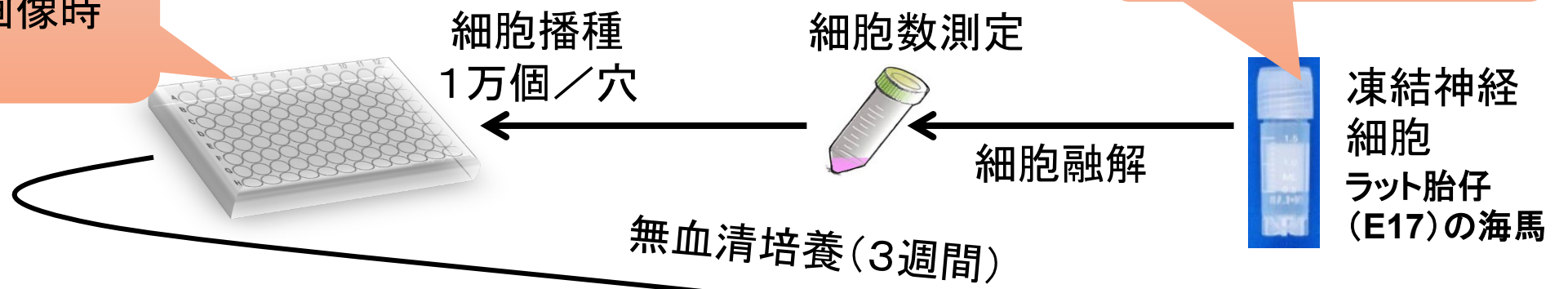
Drebrin
MAP2
Hoechst

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

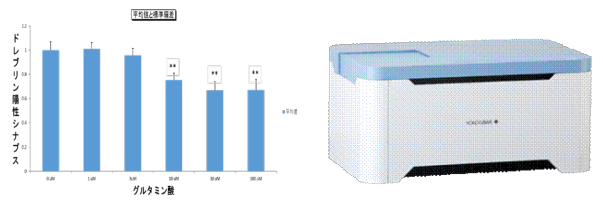
① 発達神経毒性・神経毒性を評価する頑健な神経細胞培養系の確立

平面性の高いCOPプレート(Z社・非売品)画像時間が4分の1に。

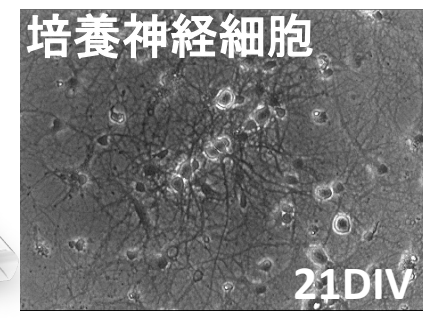
解剖技術に左右されないサンプル品質



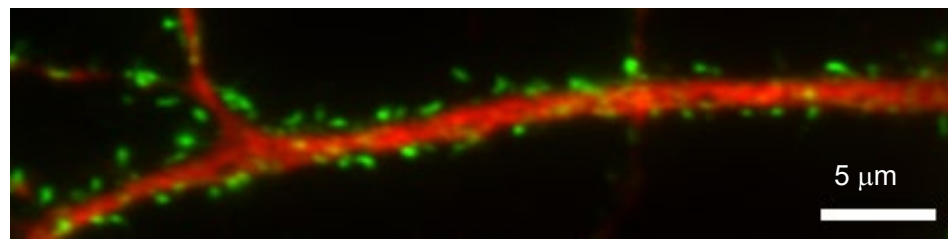
培地交換の必要がない。



画像取得・解析の完全自動化により、再現性が向上する



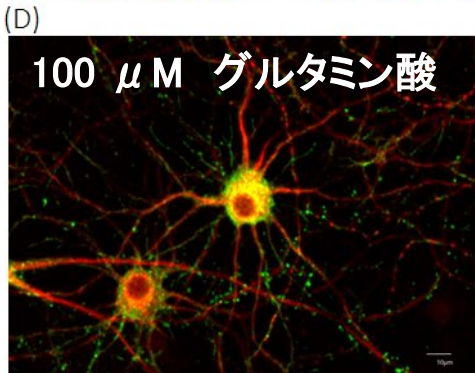
安定した培養の実現



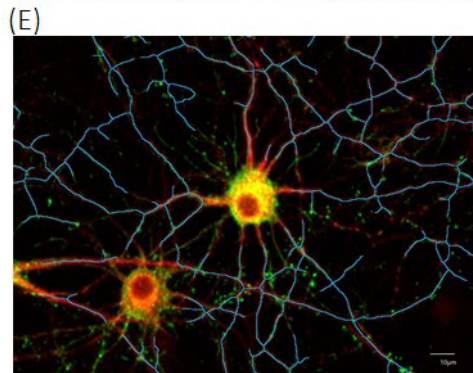
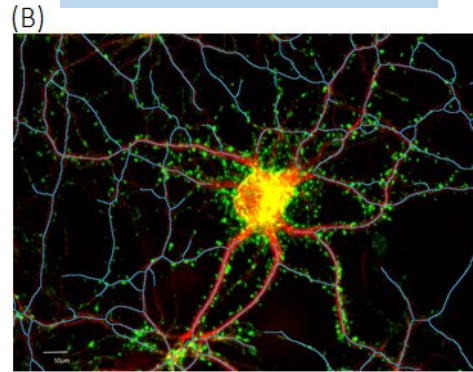
② ドレブリンクラスターの輝度分布解析法の確立

成熟した培養神経細胞のドレブリンクラスターの自動認識アルゴリズムの確立

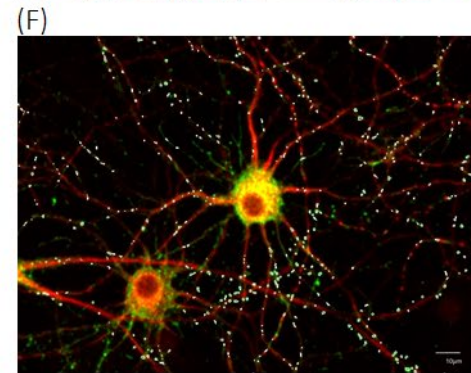
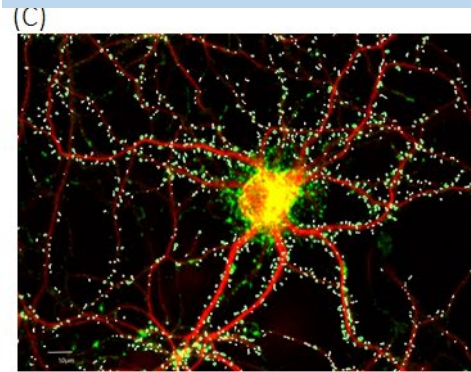
オリジナル画像



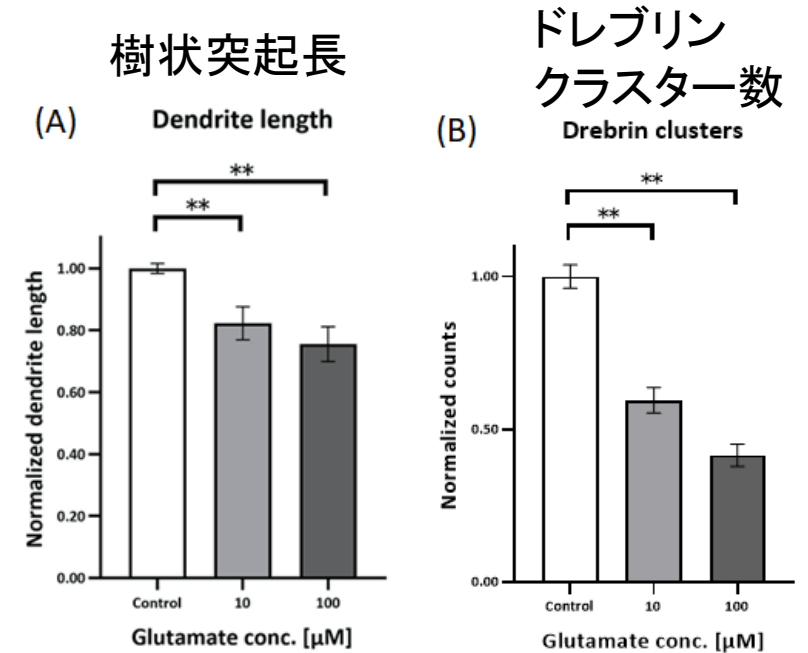
樹状突起の検出



ドレブリンクラスターの検出



定量解析

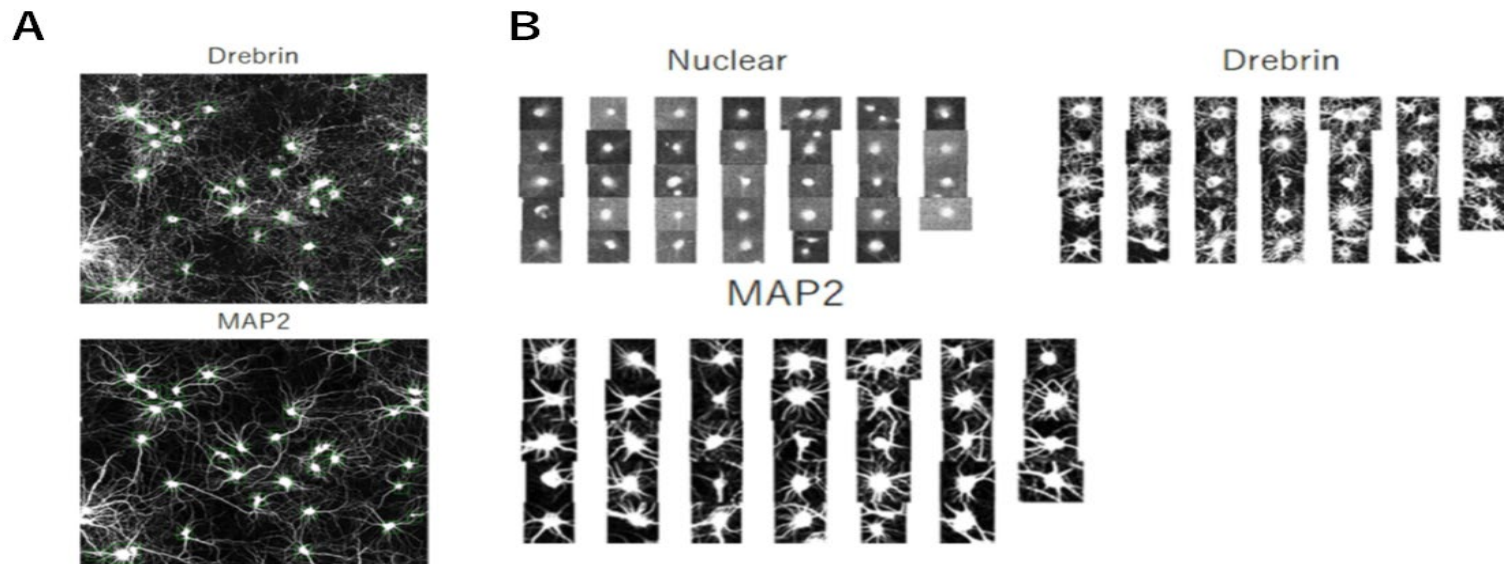


100 μ M グルタミン酸 10分間投与では、細胞死は起こらないが、樹状突起長の短縮と、ドレブリンクラスターの消失が起こる。特に輝度の高いドレブリンクラスターの消失が著しいことが分かった。

(A - D) Fluorescence images of drebrin (green), MAP2 (red) and DAPI (blue) in cultured hippocampal neurons. (A-C: control, D-F: 100 μ M glutamate)
 (B and E) Dendritic skeletons (blue lines) mapped on fluorescence images. (B: control, E: 100 μ M glutamate)
 (C and F) Drebrin clusters (white areas) mapped on fluorescence images. (C: control, F: 100 μ M glutamate) scale bar : 10 μ m

③ ドレブリン移動量に対する機械学習によるAOP評価システム構築

画像データの機械学習 (AI) 処理



- A. 輝度調整後、細胞体位置を調整し画像を切り出す
- B. 切り出されたNuclear、Drebrin、MAP2画像の例

深層学習・機械学習による画像の分類結果

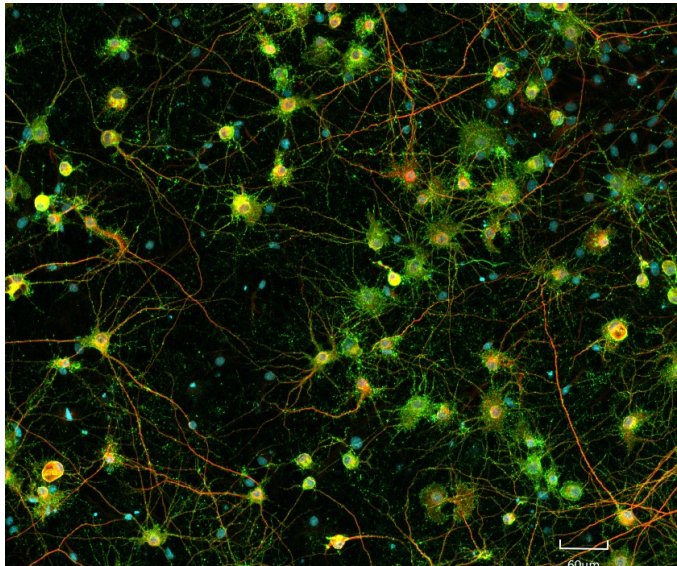
Accuracy	C1: Nuclear	C2: Drebrin	C3: MAP2
Training	0.5960	0.9291	0.9864
Validation	0.5452	0.9094	0.9925

Sensitivity	C1: Nuclear	C2: Drebrin	C3: MAP2
Training	0.5240	0.9062	0.9833
Validation	0.5594	0.9094	0.9938

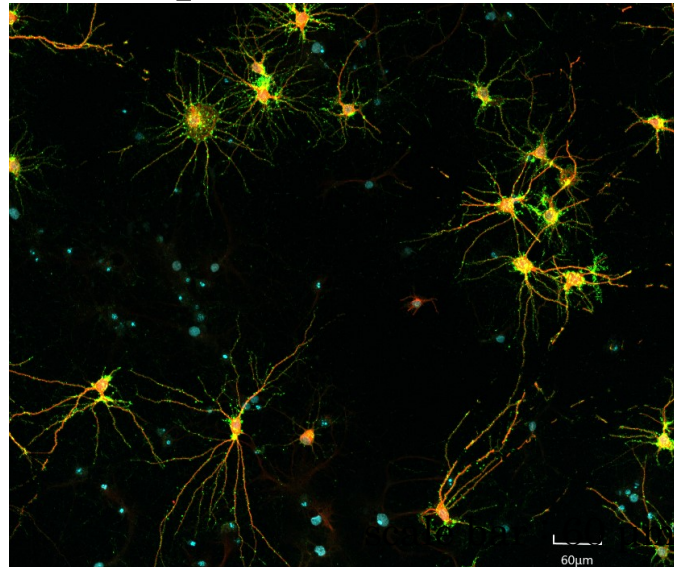
Accuracy (精度) と Sensitivity (感度) に関して、トレーニング結果と検証結果の比較を行ったところ、MAP2染色による結果の精度と感度が高いことがわかった。ドレブリンにおいても、0.9という高い数字がでた。

実験例：シナプス形成期の合成カンナビノイド投与による神経細胞死

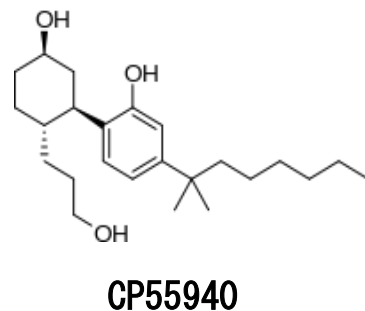
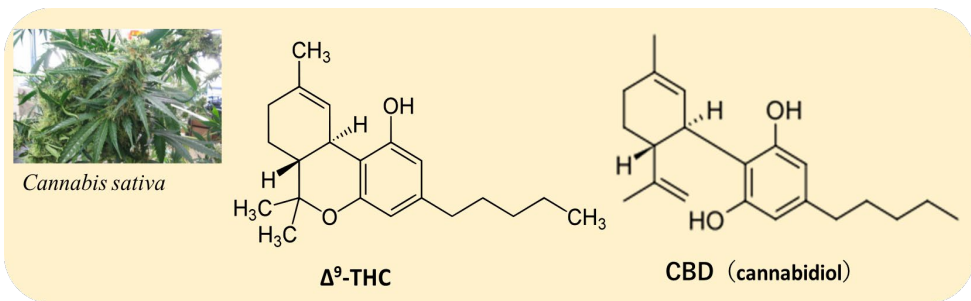
(A) Control



(B) 10 µM CP55940 (DIV7)

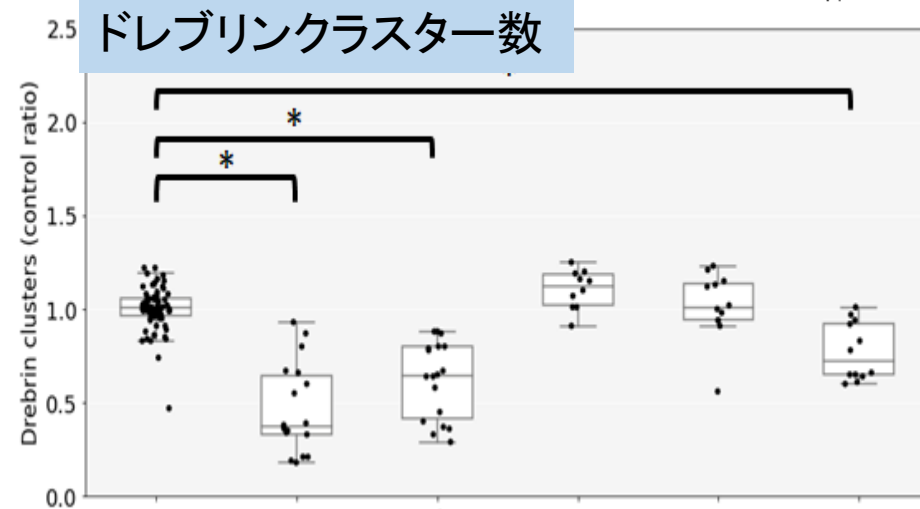
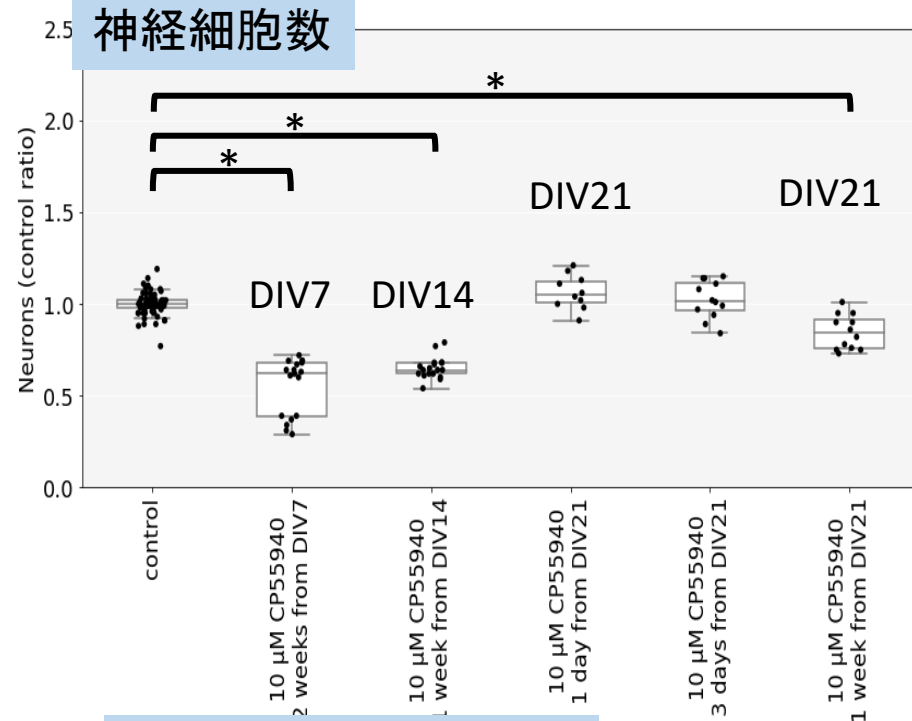


drebrin (green), MAP2 (red) and DAPI (blue)



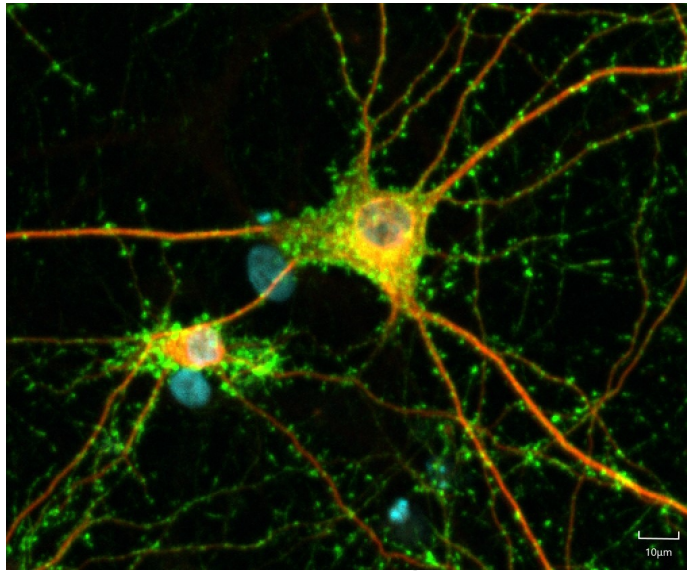
Cannabinoidと合成カンナビノイドCP55940の化学構造

カンナビノイド受容体だけでなくNMDA受容体への作用も報告されている

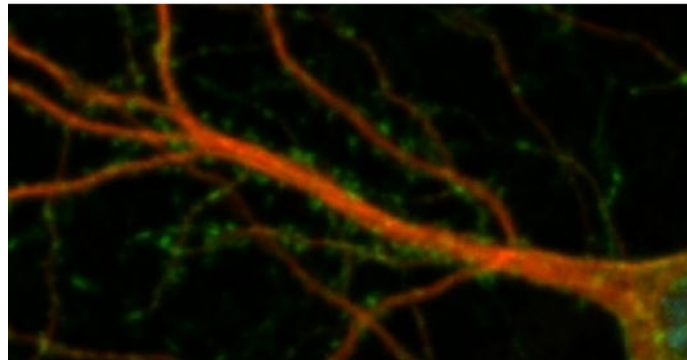


10 μ M CP55940生存細胞:ドレブリンクラスタ-数減少と異常集積

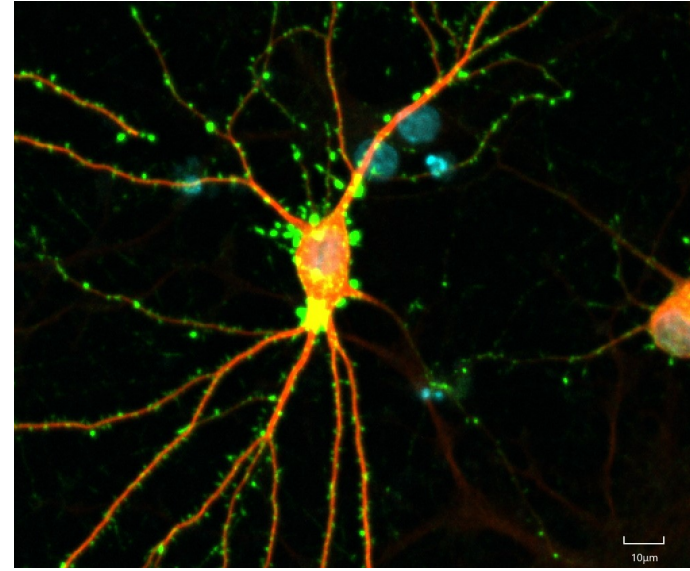
(A)



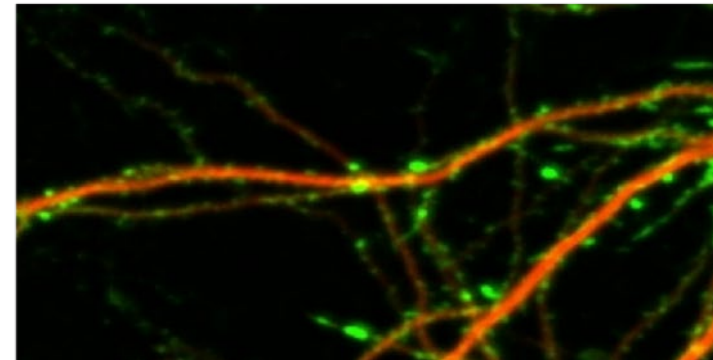
control



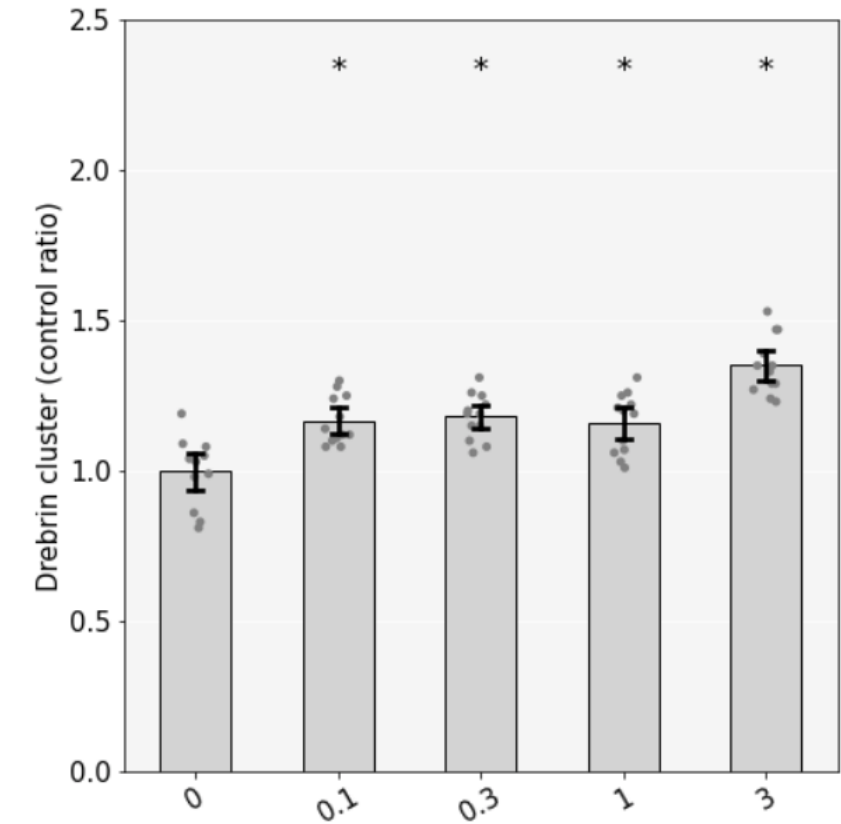
(B)



10 μ M CP55940



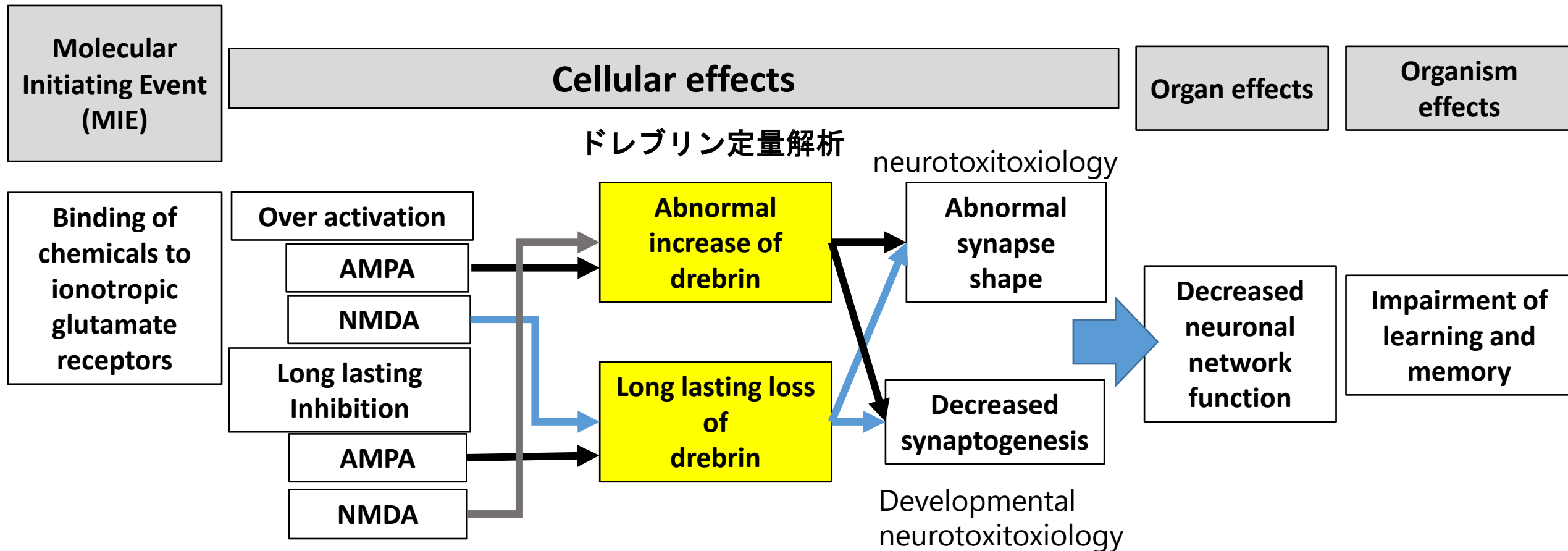
(C) 低濃度(0.1~3 μ M)ではドレブリンクラスタ-数が増加した



- (A) controlのDIV21の代表的ニューロンと樹状突起スパインのドレブリンクラスタ-
(B) 10 μ M CP55940 をDIV7に加えてDIV21で観察した場合に生存していたニューロンと樹状突起スパインのドレブリンクラスタ-

実験結果を踏まえた新規AOPの提案

本研究では、培養神経細胞の樹状突起スパインのdrebrinを定量解析し、化合物の学習記憶の機能障害をもたらす神経毒性または発達神経毒性を予測するin vitro評価系として有用であることを、複数の化合物を用いて検証する。



第9期達成目標

- 開発したプロトコルを日化協参加企業とシェアして試験化合物を増やす。
- ラット海馬神経細胞による慢性投与実験の実験プロトコルの完成および解析法に関する検討、384プレートへの播種技術の開発に着手する
- 化合物のNMDA受容体への結合を定量化する方法を開発
- AIによる画像処理の適応の検討を継続する
- ヒトiPS細胞由来神経細胞を神経毒性評価法に利用可能か検討する。

金村博士らがAMED研究班において、ヒトiPS細胞由来神経細胞のシナプス成熟プロトコルを開発している。関野は分担研究者として、分化誘導の実験プロトコルのバリデーション研究に参加している。当該神経細胞にグルタミン酸投与した場合に、ドレブリンの局在変化が観察された場合には、NMDA受容体と細胞骨格のリンクが完成していると考えられるので、本研究での使用をご検討いただく。