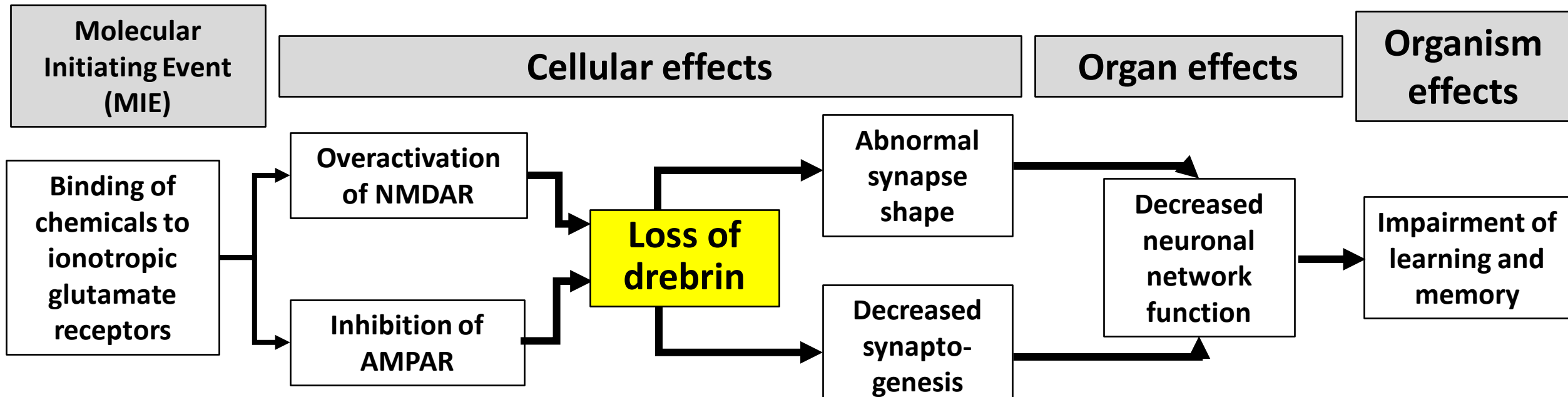


第8期採択課題

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 群馬大学大学院医学系研究科 薬理学分野 助教
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

本研究で提案する神経毒性の有害性発現経路(AOP)

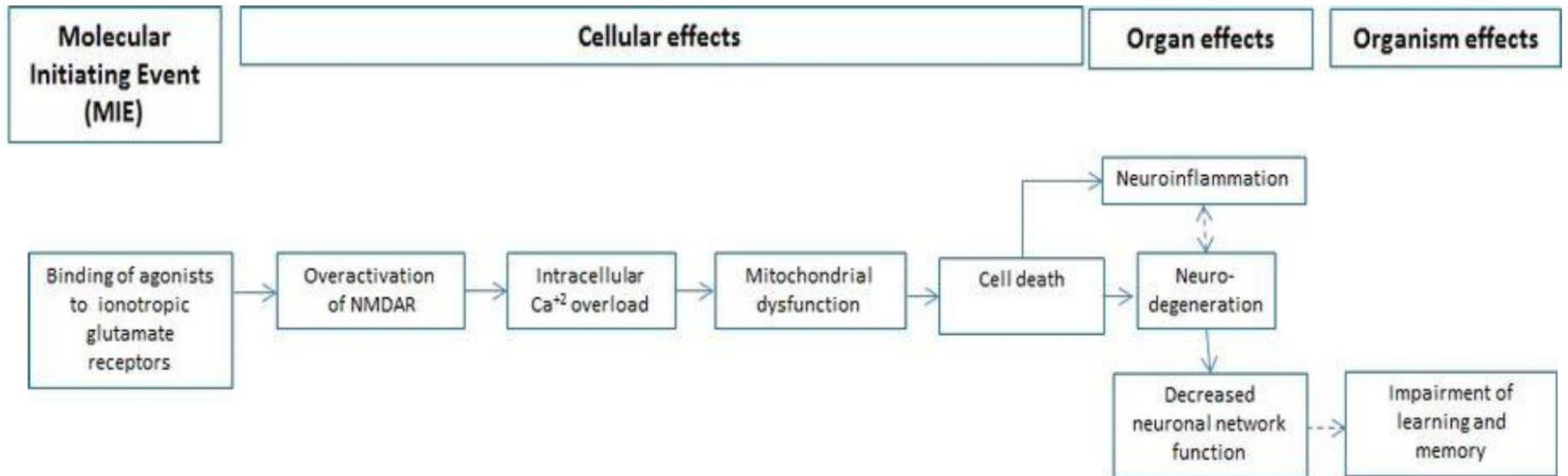


学習記憶障害はシナプス機能不全(シナプス部位に起こる機能的構造的障害)で起こることから、“Loss of drebrin”をCellular effectsとして解析する。これまで、MIEとして化合物がNMDA型グルタミン酸受容体に結合を挙げている他のAOPと比較するとEventsが簡素である。

本研究では、培養神経細胞の樹状突起スパインからのドレブリンの消失を定量解析することが、化合物の神経毒性(学習記憶の機能障害)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。

グルタミン酸イオンチャンネル型受容体とAOP

【AOP No. 6】 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 Sachana M, Munn S, Bal-Price A 09 Sep 2016



- Level of biological organization Molecularの一つとしてDrebrinがとりあげられている。

Drebrin immunocytochemistryTherefore, degradation of drebrin can be used as a readout for excitotoxicity induced by NMDAR overactivation. Degradation of drebrin can be evaluated quantitatively by Western blot analysis(mRNA level) or by immunocytochemistry (at protein level) (Chimura et al., 2015; Sekino et al.,2006).

【研究背景】 神経細胞特異的アクチン結合タンパク質ドレブリン

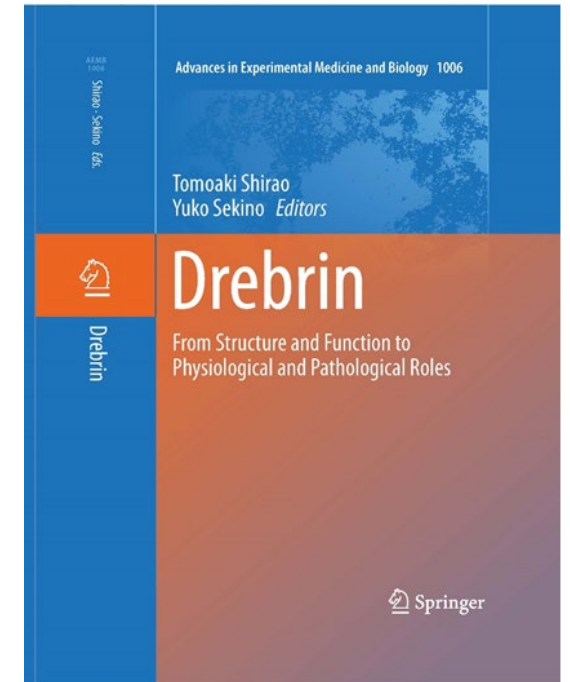
発達神経毒性の評価との関連性

- ドレブリンは脳の発生・発達に伴って増えるアクチン結合タンパク質である。
- 脳形成時の細胞移動の際には神経突起と成長円錐に発現してアクチン動態を制御している。
- 脳の発達期においては、学習・記憶の分子基盤を支える構造的モジュールである樹状突起スパイン構造を作る。

成長期または成熟後の神経毒性評価との関連性

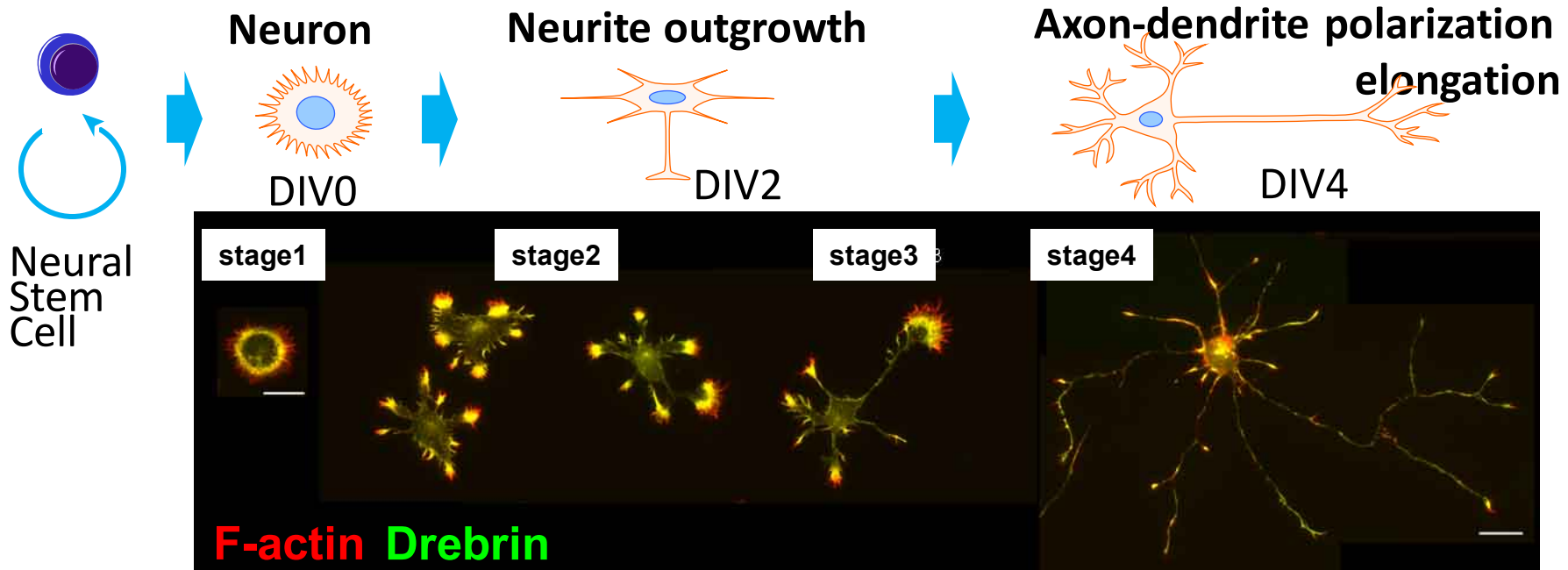
- 学習・記憶の機能的基盤である神経可塑性に伴う樹状突起スパインの形態変化を担っている。
- ドレブリンが消失したスパインでは学習の分子機構が働かない。
- In vivo 実験や臨床所見から、ドレブリン消失と記憶障害がリンクしている。

1983年：脳の発生と成長に伴って発現量が変わる大量のタンパク質を同定してドレブリンと命名された。
1996年：アルツハイマー患者脳のドレブリンが激減することが判る。



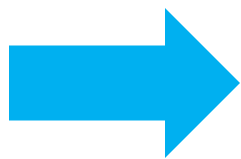
<https://www.springer.com/gp/book/9784431565482>

神経細胞の発達におけるアクチンとドレブリンの分布の変化

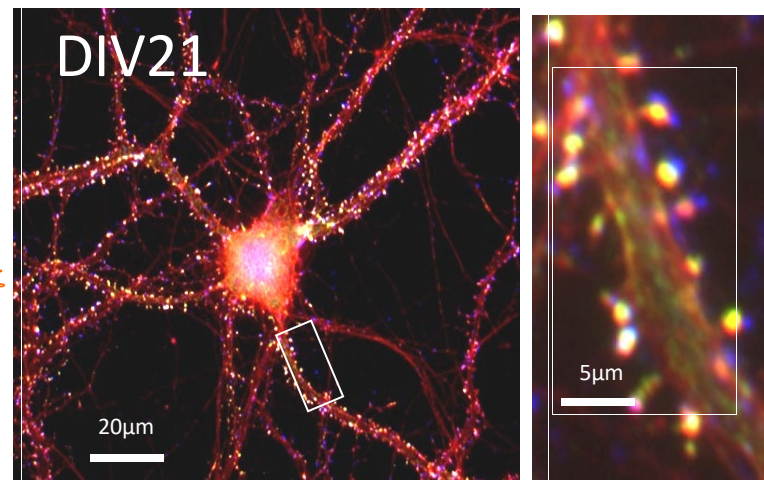
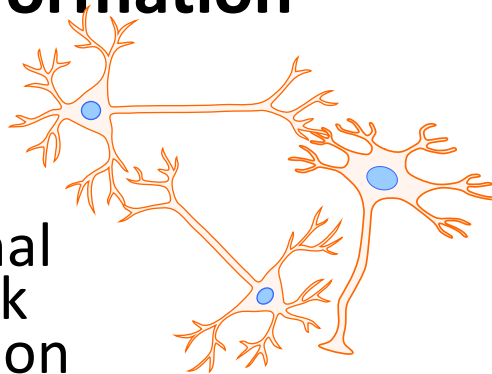


DIV10-21

Synapse formation



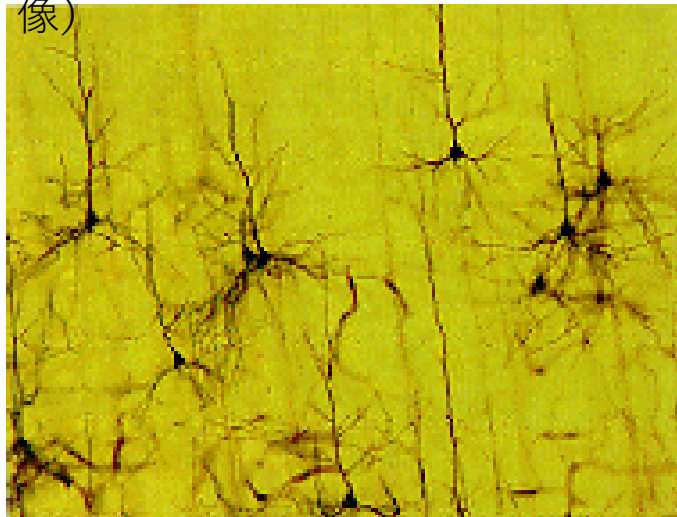
Neuronal network formation



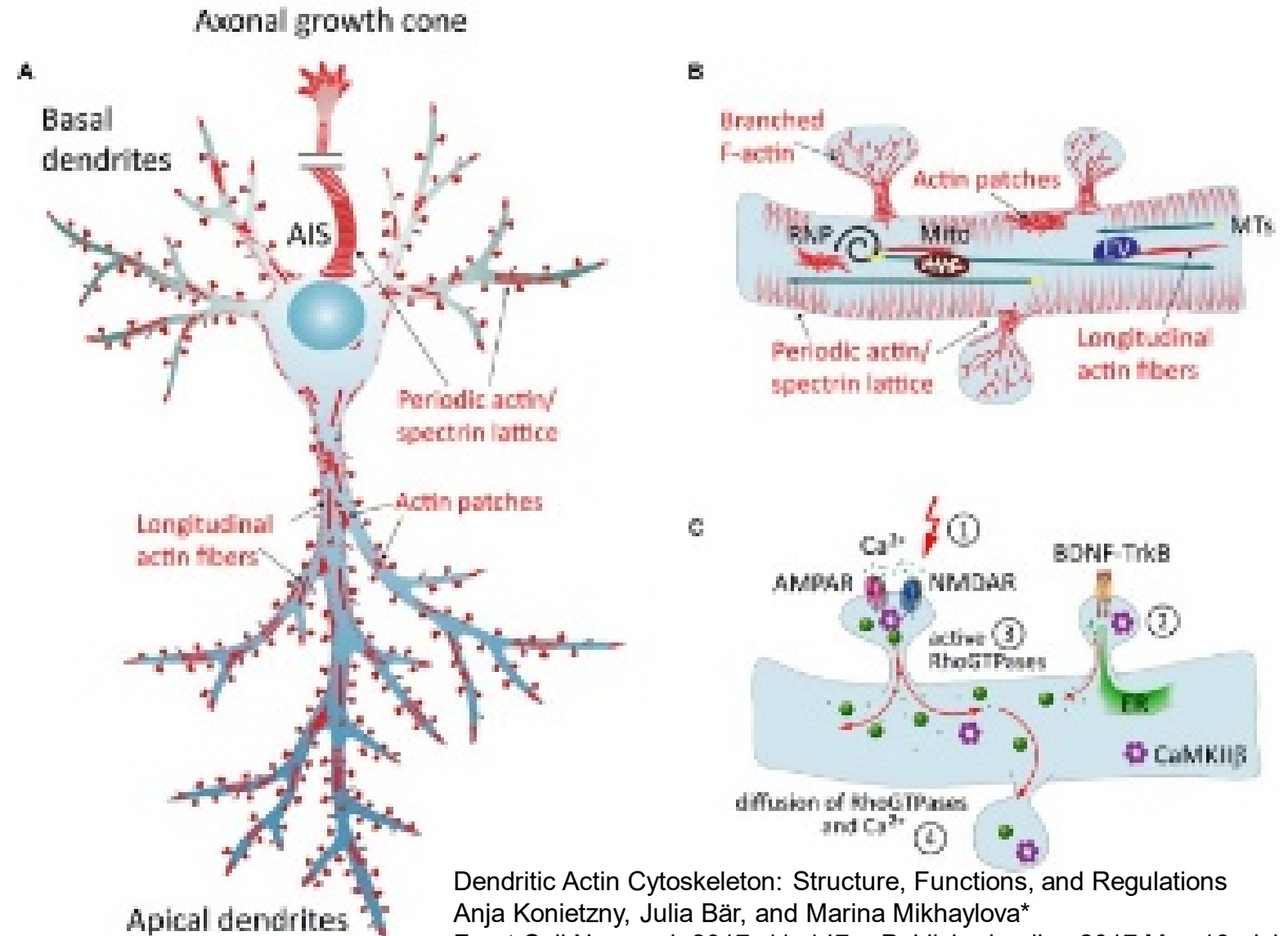
In the spine **drebrin** and **actin** are highly concentrated. **Synapsin I** staining faces to them

成熟した神経細胞の形態と細胞内アクチンの分布模式図

大脳皮質の錐体細胞（ゴルジ染色像）



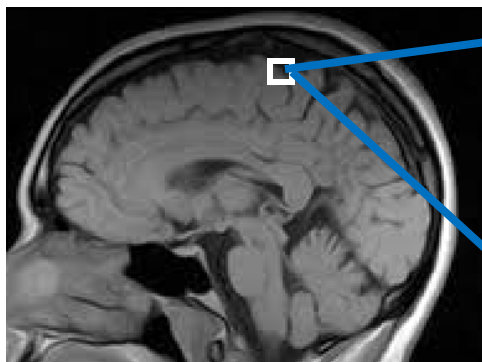
海馬の錐体細胞（ゴルジ染色像）



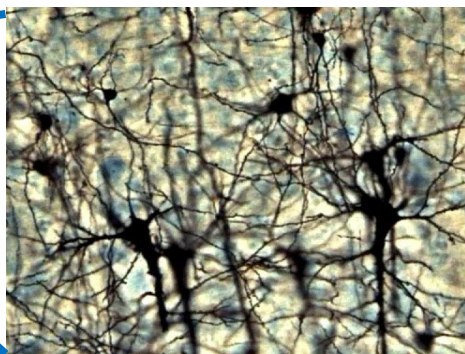
Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations
 Anja Konietzny, Julia Bär, and Marina Mikhaylova*
 Front Cell Neurosci. 2017; 11: 147. Published online 2017 May 18. doi:
 10.3389/fncel.2017.00147

学習記憶が起こる部位(シナプス)とドレブリンの関係 ドレブリンは樹状突起スパイン(シナプス後部)の形態を作る

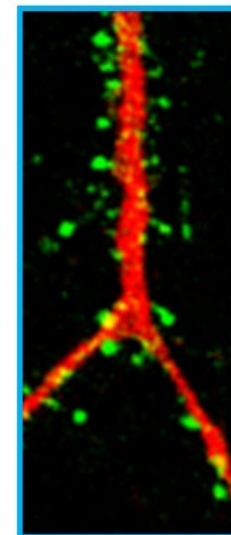
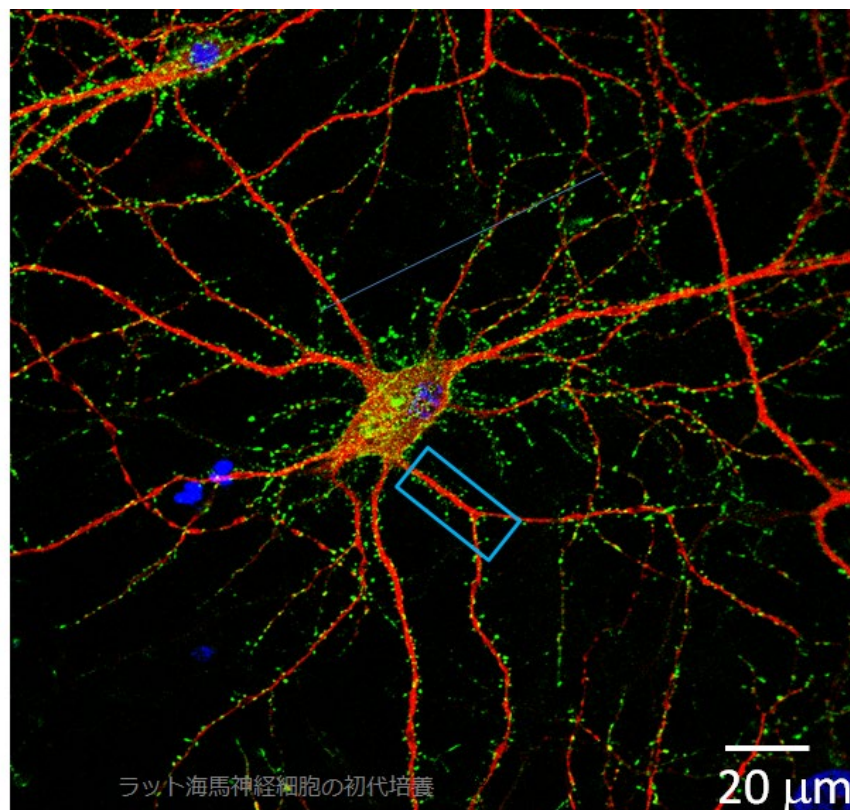
脳全体像:MRI画像



大脳皮質を構成する神経細胞の形(ゴルジ染色像)



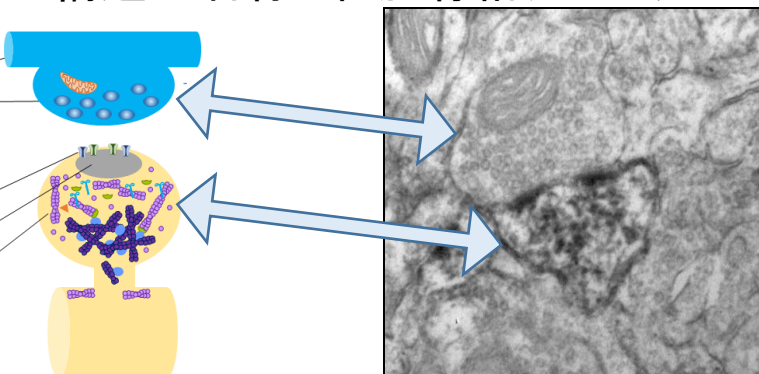
培養神経細胞: 神経細胞の形と細胞骨格タンパク分布



Drebrin
MAP2
Hoechst

シナプスの構造の名称と細胞骨格タンパク

Presynaptic terminal
axon
synaptic vesicles
Dendritic spine
receptors
postsynaptic density
actin filaments

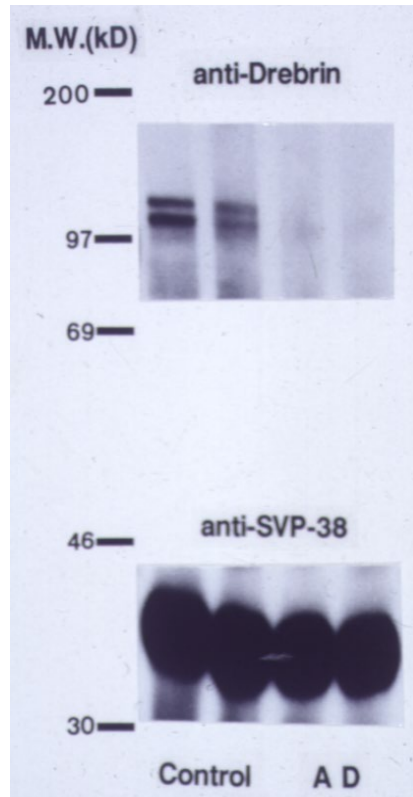


ドレブリンは受容体などのシナプス後部の機能タンパクの局在を安定化する役割を果たすアクチン結合タンパク質である。

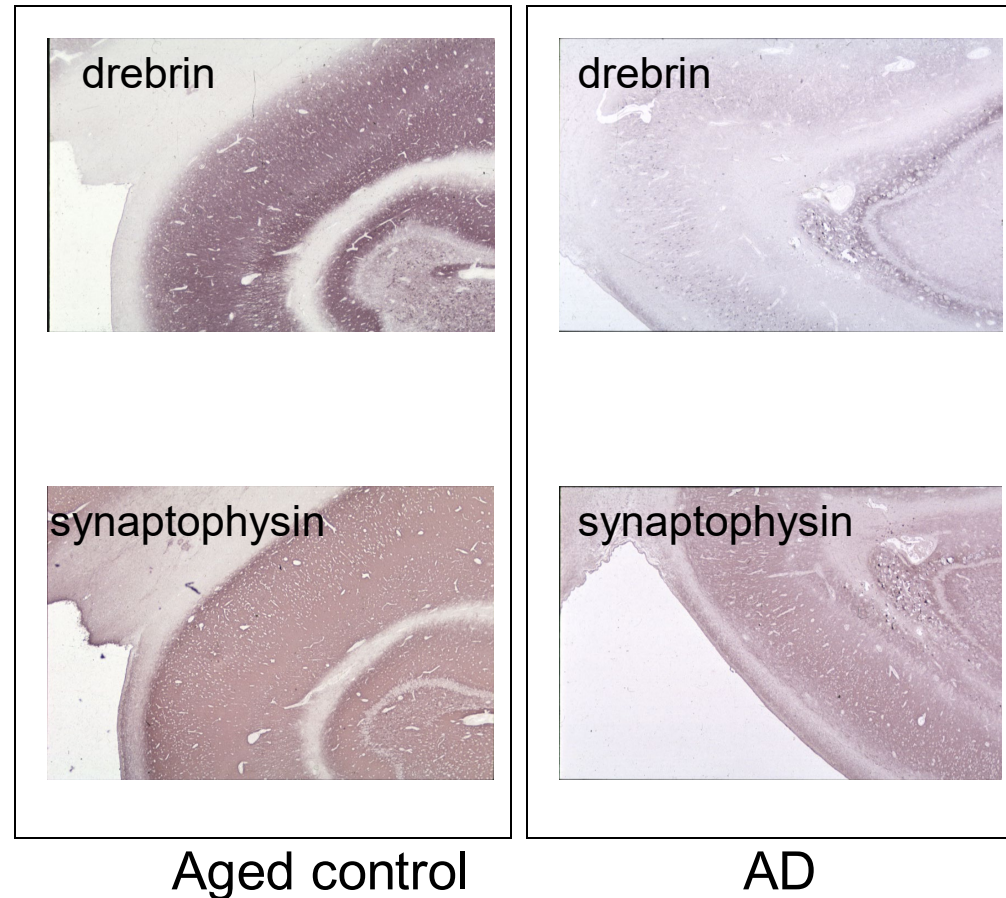
成熟した培養神経細胞(ラット)のドレブリンの分布:
緑色の構造が、樹状突起スパイン(シナプス後部構造)に集積するドレブリンの免疫細胞化学染色像

アルツハイマー病における脳内ドレブリンの減少(シナプス機能不全の原因)

Western Blotting



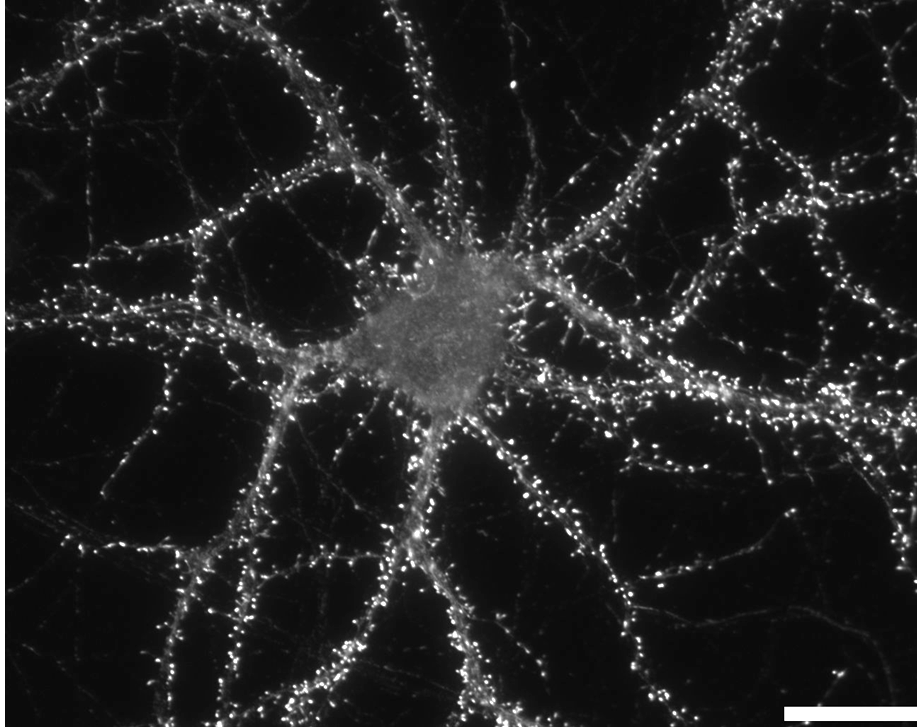
Immunohistochemistry of Hippocampus



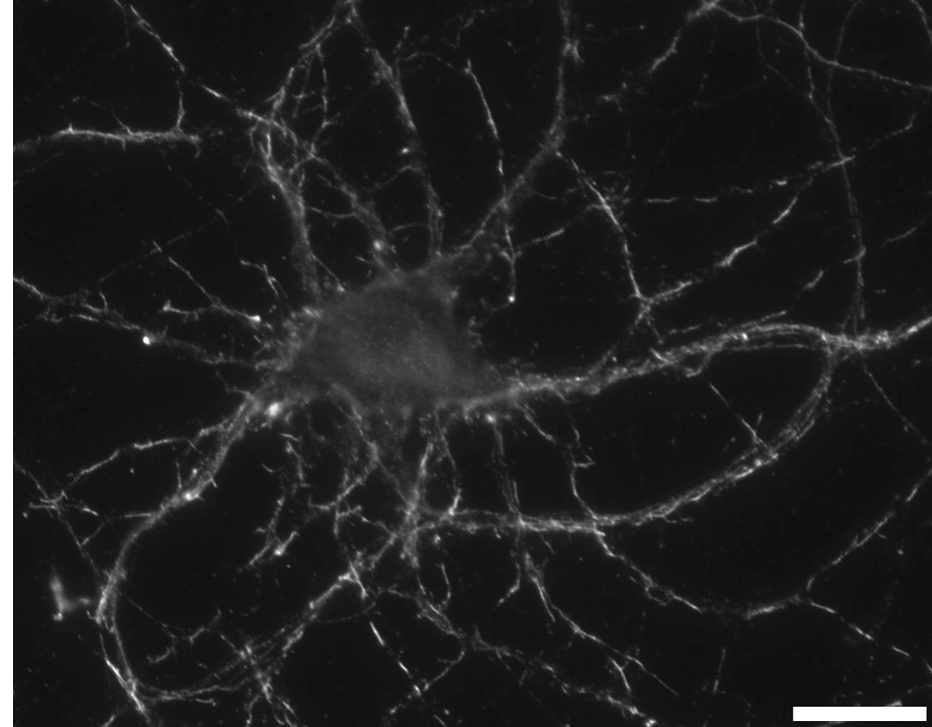
化学物質による学習記憶機能への有害反応を調べるために、免疫組織染色や免疫細胞染色などでドレブリンの減少を調べることが、時間とコストの節約になる。

グルタミン酸投与によるスパインからのdrebrinクラスター消失 (NMDA受容体活動依存性: drebrinエクソダスと命名)

A. コントロール(DIV21)の分布

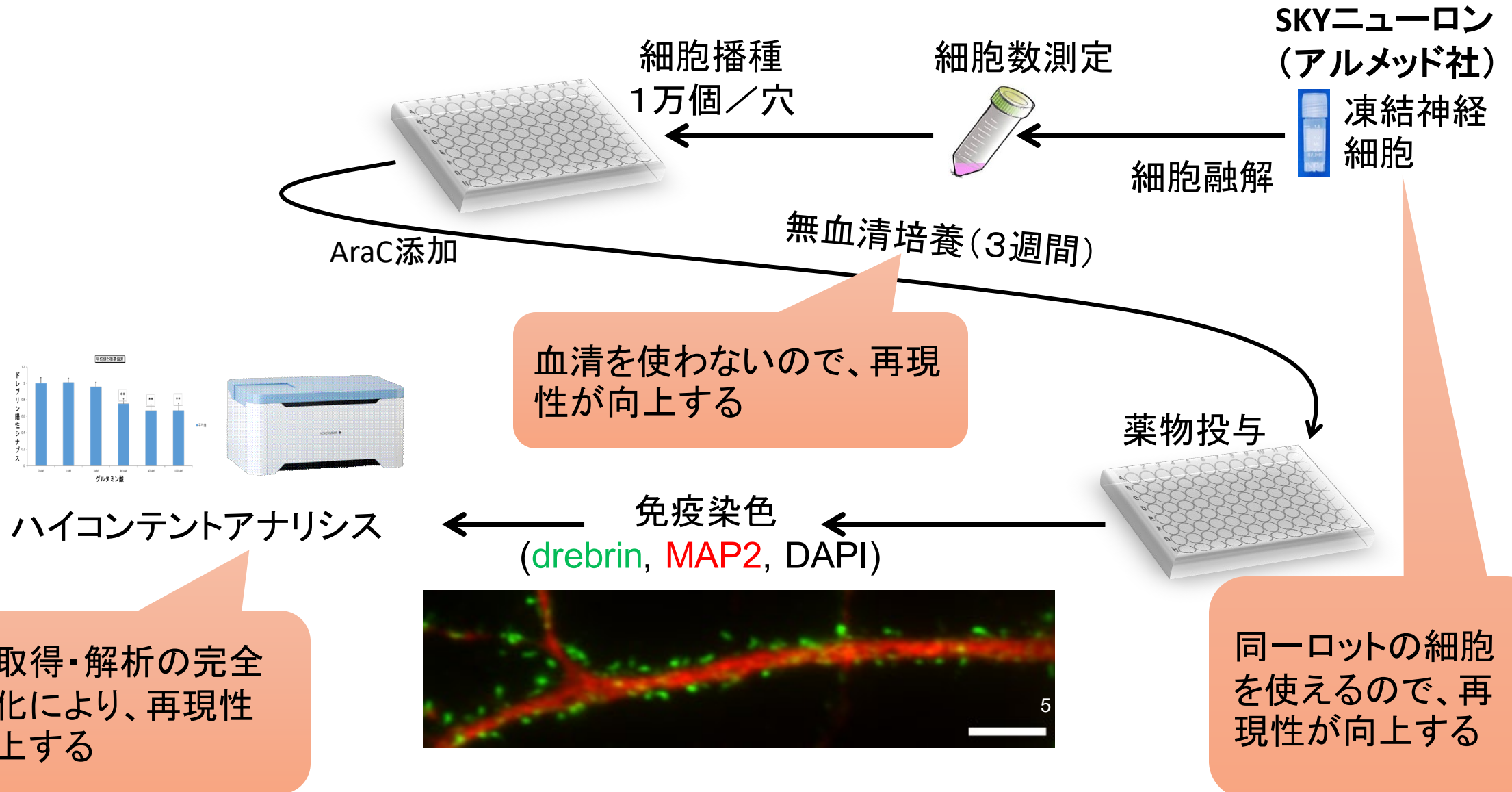


B. 100 μ M グルタミン酸 10分間投与後



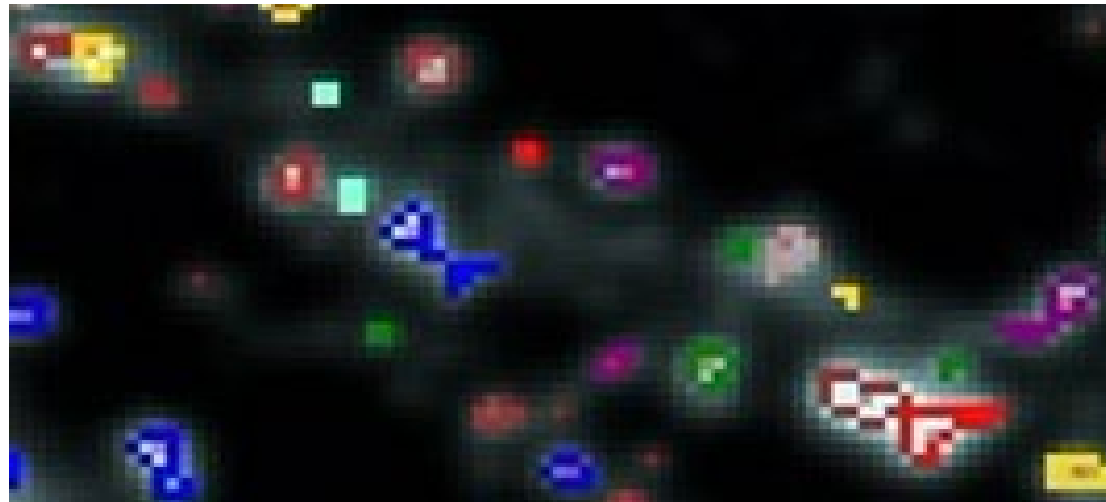
ラット海馬培養神経細胞のdrebrin分布: NMDA受容体刺激による局在変化 (unpublished photos)
A; 樹状突起スパインにdrebrinが局在しているため、drebrinクラスターとして定量的に測定することが出来る。
B. グルタミン酸を投与すると、drebrinがスパインから樹状突起の幹の方に移動する。drebrinクラスター数の減少として定量的に評価できる。

化合物の毒性試験のためのハイスループット法



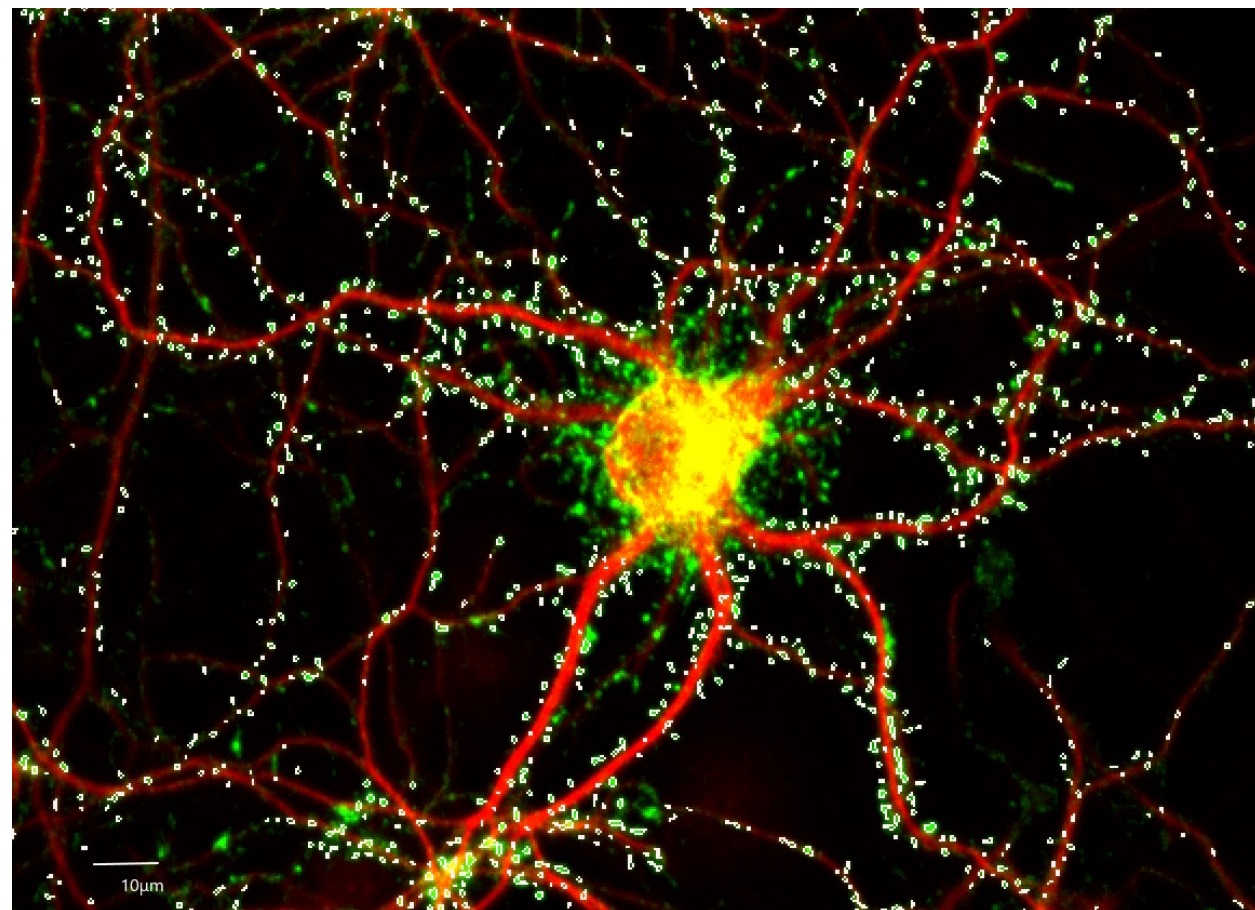
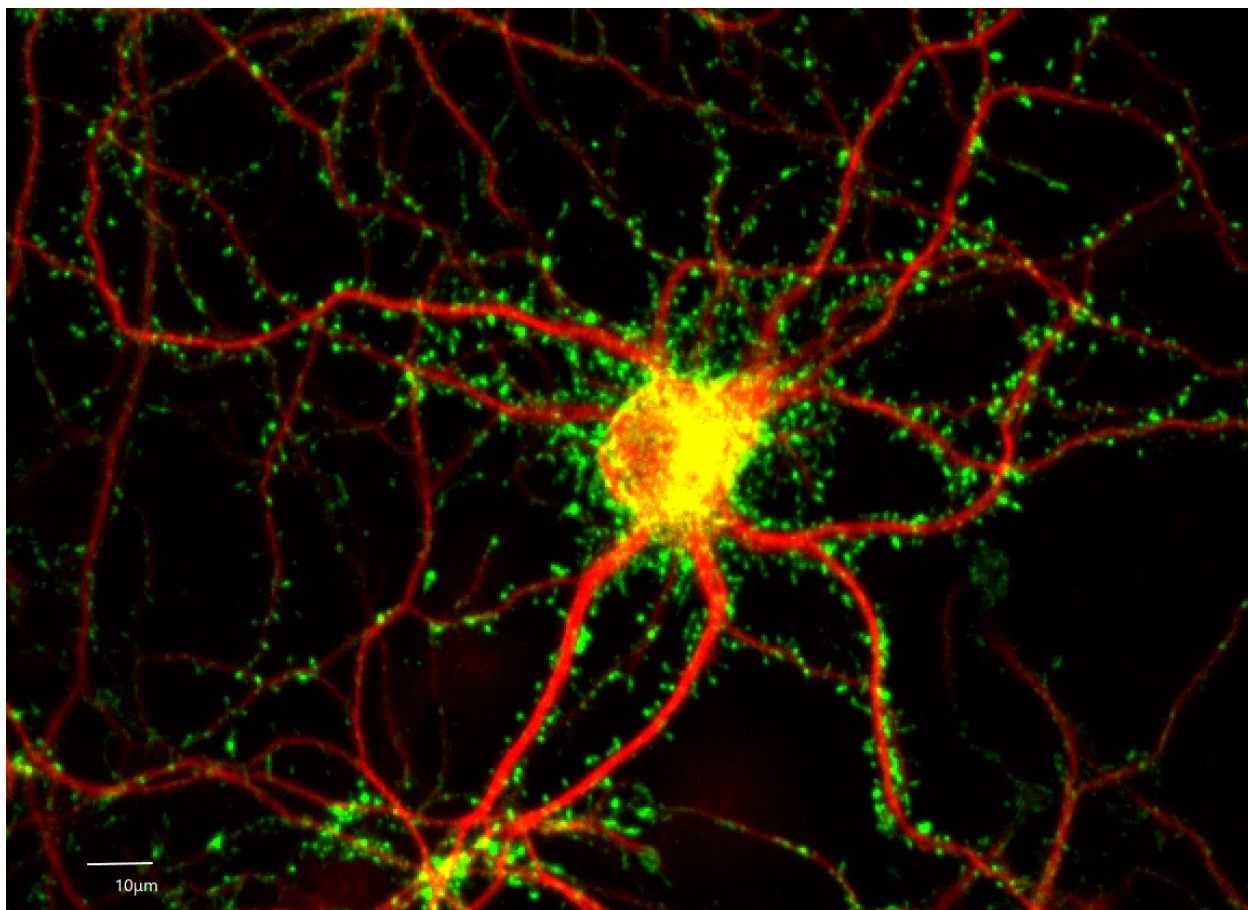
ハイスループット解析のためのアルゴリズム構築

- I . Identification of neuronal cell bodies: Neuronal cell bodies were identified by nuclear (DAPI) and MAP2 staining.
- II . Identification of dendrites: Dendrites were identified by segmentation of the MAP2-positive regions.
- III . Identification of dendritic peripheral area .
- IV . Identification drebrin clusters



解析アルゴリズムは、群馬大学大学院医学系研究科D2 間瀬省吾氏により構築されたものを採択した。
解析、グラフ化は間瀬氏が担当

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



(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 skeltons (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

まとめ

- 本研究では、ドレブリンの消失をKey Event(KE)とする発達神経毒性や学習障害を有害事象(AO)とする有害性発現経路(AOP)を提案する。
- 神経毒性によるドレブリン消失は学習記憶障害に直結することから、神経細胞死をKEとする既存のAOPに比べて簡便な神経毒性評価法となる。
- 実験の再現性を高めるために、ラット胎児海馬から作成した凍結神経細胞を使い、実験プロトコルはすでに多施設でバリデートされた96ウエルプレートへの播種法を採用する。現在はグルタミン酸の作用の濃度依存性を解析中である。
- 画像解析の迅速性を高めるために、共焦点定量イメージサイトメーター(CQ1;yokogawa)で撮像した画像から、画像解析ソフト(セルパスファインダー)でドレブリンクラスターを自動認識するアルゴリズムを構築し、グルタミン酸処理によるドレブリンクラスター数の減少を定量的に測定できることを示した。
- 今後、AIを用いて、その他の特徴抽出を行っていく。ヒトiPS細胞の利用については、年度の後半に取り掛かる予定である。