

アストロサイトもヒト由来の細胞であることが好ましいため、CDI社製のヒト iPS 細胞由来アストロサイトである iCell Astrocytes を用いてマウス由来のアストロサイトと同様の実験を行ったところ、iCell Astrocytes はマウス由来アストロサイトより軸索伸展に関しては強い伸張促進作用を有していたが (Fig. 18)、2 ヶ月間 iCell Neurons に作用させても自発性興奮作用を誘導できなかった (Fig. 19)。

### 脳神経機能を再現したヒト iPS 細胞由来神経細胞等およびそれをを用いた薬理評価系の開発 (佐藤)

#### 1. 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜—ReproGlu について

Fig. 20 に Repro-Glu の培養 1-33 日目までの経時的な位相差顕微鏡像を示す。Repro-Glu は 14 日目ぐらいから非常に増殖が激しくなり、27 日目以降では個々の細胞の判別が困難となった。

我々は、Ca<sup>2+</sup> イメージング法を用いた機能的受容体発現数値化プロトコルを確立し、機能的受容体発現に基づき hiPSC-neuron の選抜条件整備を進めている。そのプロトコルとは、①自発発火が起こっているか、それが同期しているかどうかを確かめ神経回路形成を確認する、②TTX 存在下、ATP (100 μM), L-Glu (100 μM), GABA (100 μM), HighK<sup>+</sup> (80 mM) を適用し、これらの機能受容体の発現について確認する、③ AP-5 単独、AP-5 と DNQX のカクテルが L-Glu への反応に影響を与えるか=L-Glu 受容体サブタイプを同定する、の 3 段階より構成されている。Fig. 21 は上記②において、各種リガンドに対して反応を示した細胞の割合を経時的に示した図である。電位依存

性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを発現している細胞は 80 mM の high K<sup>+</sup> に反応するので、細胞が確かに生存していることを high K<sup>+</sup> 適用により確認できる。Repro-Glu はほとんどの細胞が 21 日までいずれのリガンドに対しても反応を示さず、28 日目に ATP, L-Glu に反応する細胞が現れた (Fig. 21A)。L-Glu に対しては 34.8% の細胞が反応した。28 日目以降は細胞増殖が激しく 35 日目には細胞がはがれてしまったため、実験は 28 日目までとなっている。Fig. 21B に典型的な 28 日目の Ca<sup>2+</sup> 流入トレースを示す。細胞への Ca<sup>2+</sup> 流入量は非常に小さかった。L-Glu への Ca<sup>2+</sup> 応答に対する AP-5 単独、AP-5 と DNQX のカクテルが与える影響について検討した (Fig. 22)。L-Glu が引き起こす Ca<sup>2+</sup> 流入量が非常に小さいにもかかわらず、L-Glu への反応性を示したほぼ全ての細胞において AP-5 単独で L-Glu への反応が協力的に抑制された。AP-5, DNQX カクテルはさらに反応を抑制した。Fig. 3B に本薬理実験の典型的な Ca<sup>2+</sup> 流入トレースを示す。以上の結果から、Repro-Glu は L-Glu への反応を示す細胞が現れる時期が遅いこと、その比率も低く Ca<sup>2+</sup> 流入量も低い、L-Glu への反応性を示した細胞では NMDA 受容体が機能していることが示された。

28 日目までの Repro-Glu の細胞組成を免疫組織化学的手法により検討した。TuJ1 (神経細胞マーカー)、Nestin (神経幹細胞マーカー)、GFAP (ラジアルグリア、アストロサイトマーカー) の発現を検討したところ (Fig. 23)、神経細胞、神経幹細胞、ラジアルグリアあるいはアストロサイトの全てがそろっていることが確認された。28 日目まで Nestin(+)GFAP(+) 細胞が確認されたことから、この時期まで神経幹細胞が

存在していることがわかった。その他の GFAP(+) 細胞がアストロサイトなのかどうかについて GFAP 以外のアストロサイトマーカーである S100 $\beta$  (アストロサイトに存在する Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質)、glutamine synthase (GS) (グルタミン酸からグルタミンを合成する酵素) と GFAP との共染色によって検討した (Fig. 24)。S100 $\beta$ (+)GFAP(+) 細胞、GS(+)GFAP(+) 細胞ともに確認されたことから、Repro-Glu ではアストロサイトが誘導されてくることがわかった。GABA (GABA 作働性神経細胞の神経伝達物質)、Tuj1 の共染色により、GABA 作働性神経細胞の含有率を解析した (Fig. 25)。1 視野中全神経細胞における GABA 作働性神経細胞の割合を算出したところ、培養 21 日以降は 10-20% に落ち着いた。前脳の GABA 作働性神経細胞含有率は 10-20% といわれており、Repro-Glu が前脳の細胞組成に近いことが示唆された。hiPSC-neuron の場合、標本によっては神経系以外の細胞が誘導されるときがある。そこで、Repro-Glu に平滑筋細胞が誘導されているかどうかについて平滑筋マーカーである  $\alpha$ -sm1 の発現を確認することにより検討した (Fig. 26)。14 日目には well の全体に  $\alpha$ -sm1(+) 細胞が存在しており、培養日数が長くなるに従いその数が増加することがわかった。

シナプスの成熟度についても免疫組織化学的手法を用いて検討した。前シナプス部の成熟を検討するため、Vglut2, synapsin1 の局在について検討した (Fig. 27)。Vglut2 は L-Glu 作働性神経神経終末のシナプス小胞に、神経伝達物質 L-Glu を取り込むトランスポーターであり、synapsin1 はシナプス小胞から神経伝達物質を放出するための SNARE 蛋白質の一つである。機能が成熟

した前シナプス部ではこれら二種のタンパク質が共局在しているはずである。7 日目において Synapsin1/Vglut2 の共局在が確認された (Fig. 27A, B)。21 日目においても局在が確認できたが、細胞数増加が際だってきたために神経繊維だけのイメージングが困難となった。後シナプス部の成熟を検討するために、MAP2 と drebrin の分布について検討した (Fig. 28)。7 日目では MAP2(+) 樹状突起に細長く伸びた Drebrin(+) dendritic filopodia が観察された (Fig. 27A, B)。28 日目には MAP2 のシグナルから独立した drebrin(+) のシグナルが多数見受けられた。神経細胞以外の drebrin(+) 細胞が現れた可能性も考えられる。前シナプス部、後シナプス部の染色結果を考え合わせると、十分な機能的シナプス形成には達していないと考えられる。

## 2. 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の機能促進条件の検討

iNeuron はほぼ 100% の細胞が神経細胞のみで構成されていることをすでに確認している。従って、本標本はグリア細胞由来因子の神経機能発現促進因子の探索に適している。我々は、L-Glu 受容体のリサイクリングに関連していることが最近報告されたアストロサイト由来因子 X について、iNeuron の神経機能発現に与える影響を検討した。培養 4 日目の iNeuron (神経突起が接触するタイミング) を 5 日間 X で処理し、fura-2 Ca<sup>2+</sup> イメージング系を用いた薬理実験を行った。X 非処理群で AP5 が有効であった細胞数は 51 細胞中 18 細胞であった。一方、X 処理群で AP5 が有効であった細胞数は 71 細胞中 68 細胞であり、ほぼ全ての細胞で NMDA 受容体の機能的な発現が誘導されたことがわかった。視野中全細胞の Ca<sup>2+</sup> 流入の変化について

解析したところ、X 非処理群において AP-5 は L-Glu による  $\text{Ca}^{2+}$  流入に対してほとんど影響を与えなかったのに対し、X 処理群では AP-5 が有意に  $\text{Ca}^{2+}$  流入を減弱させた (Fig. 29A)。両群ともに AP-5 + DNQX 処理で L-Glu による  $\text{Ca}^{2+}$  流入がほとんど消失した。X 非処理群、X 処理群における典型的な  $\text{Ca}^{2+}$  流入トレースを Fig. 29B に示す。また、X 非処理群、X 処理群で AP-5 が有効であった細胞あたりの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の変化を比較したところ、X 処理群のほうが顕著に流入量が低下していた (Fig. 29C)。

#### D. 考察

##### ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 in vitro 医薬品安全性評価法の開発 (白尾)

薬物を投与した際に惹起されるシナプス機能変化を Drebrin-imaging-based evaluation of synapse function (DIBES 法) により数値化できることが再現性良くできることが明らかとなった。アミロイド  $\beta$  オリゴマー、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬及びアロプレグナノロンのシナプスに及ぼす効果を、DIBES 法により定量的に検定することが可能であることがわかった。これらのことは、DIBES 法が医薬品安全性評価へ応用できることを示唆している。

一方、ELISA 法を用いて、ドレブリン発現量を各アイソフォーム特異的に  $\text{ng} / \text{ml}$  のレベルで定量できることが示された。しかしながら、生体内のドレブリン量の測定は試験管内のものより低めに測定されることが示唆され、使用抗体のさらなる開発が必要であることがわかった。

また、ヒト iPSC-neuron (iNeuron 及び Ripro

DA) に DIBES 法を適用することにより、これらの neuron においては、正常のシナプスの出現は認められず、成熟促進のための方法の開発が必要であることがわかった。

##### 脳疾患を再現した in vitro 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞等の構造・機能の解析 (池谷)

CNQX 処置下において、海馬 CA3 野の錐体細胞から記録した興奮性シナプス入力の強度は有意に減弱した。CNQX は非 NMDA 受容体拮抗薬であることから、この結果は当然想定されるものであった。しかし、抑制性シナプス入力是非 NMDA 受容体を直接介さないにも関わらず、興奮性シナプス入力と同様に CNQX 処置により強度が減弱していた。これは一見すると、意外な結果であるが、興奮性細胞と抑制性細胞のどちらもグルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス入力により駆動されることを考えると、妥当な結果といえる。CNQX 処置下では抑制性細胞への興奮性シナプス入力も減弱している。そのため、抑制性細胞の活動が減少したと考えられる。抑制性細胞にはさまざまな種類の細胞が存在するが、抑制性入力の中心を担うのは、興奮性細胞の細胞体に投射する basket 細胞である。basket 細胞は高頻度で繰り返し発火 (バースト発火) する性質が知られており、個々のバースト発火に含まれる発火数が減少したために、興奮性細胞の受ける抑制性入力の強度が減弱したと推察される。

興奮性シナプス入力の減弱に対して、basket 細胞は活動量を減らし、それにより興奮性細胞が大半を占める回路全体の活動量は保たれたままであった。抑制性細胞と興奮性細胞の興奮性シナプス入力の減少に対する応答性の違いは、それぞれの細胞の

樹状突起の形態と情報統合様式の違いによるものではないかと考えられる。basket 細胞の一部は、興奮性細胞や他の抑制性細胞と異なるチャンネル分布や情報演算機構を持つことが知られている。また、情報伝達における NMDA 受容体の寄与が他の細胞に比べ低いことも示唆されている。こうした性質を持つため、basket 細胞は非 NMDA 受容体拮抗薬の影響を受けやすく、興奮性シナプス入力の前減弱により活動量が減ったのではないかと考えられる。

過剰な興奮性神経伝達の亢進は過剰な同期活動を誘発し、てんかん発作を引き起こす。こうした背景から、近年、てんかん治療薬として非 NMDA 受容体拮抗薬が開発された。従来の抗けいれん薬は、チャンネルや GABA 性の機能に焦点を当て、けいれんを抑制するものが主流であった。しかし、既存の治療薬では 30% ものてんかん発作がコントロールできていないとされており、新規作用機序を持つ治療薬開発の意義は大きい。特に、非 NMDA 受容体拮抗薬は顕著な副作用が少ないことから有用性が期待されているが、その詳細な作用機序に関しては明らかになっていない。

本研究では、非 NMDA 受容体拮抗薬は正常な状態の自発活動に影響を与えることなく、過剰に亢進した同期活動のみを抑えることを示した。この結果から、興奮・抑制のバランスが保たれている場合、回路の活動は非常に安定して保たれるものの、一度バランスが崩れると非 NMDA 受容体拮抗薬により活動が容易に抑制されることが示唆された。しかし、どのようにして、過剰な同期活動のみを選択的に抑制するのかまでは明らかになっておらず、今後、詳細な検討が必要である。

## グリア細胞を利用した神経回路形成及び多点平面電極システムによる安全性評価試験法の確立 (宮本)

iCell Neurons 単独では自発性興奮が観察されなかったが、マウス由来のアストログリア細胞調整培地を 2 ヶ月間作用させることにより、自発性興奮を数値として検出することが可能となり、このとき得られた応答は、複数電極間で同調し周期性を持つことから回路形成が成立している可能性が示唆された。iCell Neurons 及びラットの初代培養大脳皮質ニューロンの自発性興奮は、GABA 受容体の阻害剤である GABAzine により用量依存的に増強されるため、薬剤による痙攣誘発作用の良い数値化指標となる可能性が示された。また、この興奮増強作用は、複数電極間で同調し周期性を持った部分のみに観察されるため、特にこの同調した周期的自発応答が薬剤による GABA<sub>A</sub> 受容体の阻害に関わる良いバイオマーカーになる可能性が考えられた。この同調した自発性興奮は、神経伝達物質放出阻害薬である ATX 及び CTX により阻害されるため、本実験系ではシナプス伝達を誘導できている可能性が示された。神経回路形成成熟度の数値化に関しては、本研究での成果を元に次年度はより高度な回路分析のための新規アルゴリズム開発を目指す。

iCell Neurons のマウスアストロサイトによる自発性興奮誘導が非常に長期間必要なこと、及び iCell Neurons 以外の hiPSC-neuron である ReproNeuro Glu 及び ADhNPC の自発性興奮を誘導することには成功していないことから、グリア細胞の可溶化因子による hiPSC-neuron 等の自発性興奮誘導の機能発現促進機構の解明が重要と考えられる。グリア細胞調整培地刺激及び未刺激 iCell Neuron のマイクロアレイ

による網羅的遺伝子解析を現在進めており、刺激初期及び2ヶ月刺激で生ずる遺伝子発現プロファイルの変化により、電気生理学的に自発性興奮するまでのニューロンに成熟するために必要な分子マーカーの抽出を試み、分子マーカー候補が得られた場合、シグナル伝達パスウェイにおいてその分子の上流に位置する既知刺激物質による神経成熟方法の確立、及び成熟期間の短縮が期待できる。

### 脳神経機能を再現したヒト iPS 細胞由来神経細胞等およびそれを用いた薬理評価系の開発 (佐藤)

#### 1. 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜—ReproGlu について

Repro-Glu は非常に増殖性が高い細胞であることが判明した。我々のデータにおいて、Nestin(+)GFAP(+) の radial glia が 28 日目にも確認されたことからわかるように、neural stem cells もしくは radial glia が増殖していることが予想される。細胞をリリースするタイミングが早すぎるのではないかと予想され、ユーザー側だけで解決するのは非常に難しい問題である。一方、GS などの機能蛋白質を発現しているアストロサイトが分化してきたことは興味深い。これまで入手してきたラインにおいて、ほとんどの場合、アストロサイトマーカーが発現しても機能蛋白質を発現しておらず、アストロサイトとしての機能を果たすかどうか疑問であった。したがって、本ラインによって機能蛋白質を発現するアストロサイトが入手可能になるかもしれない。また、GABA 作働性神経細胞含有率は 10-20% と前脳の含有率を再現していることが確認された。ちなみに、Repro 社の中脳に向け

て分化を進めた Repro-DA は GABA 作働性神経細胞の含有率が 40-50% とこちらも中脳の GABA 作働性神経細胞の含有率を再現している。Ca<sup>2+</sup> イメージングでは自発発火がおこっていなかったことから、シナプス形成、神経回路形成には至っていないと考えられる。後シナプス部の成熟マーカーである drebrin のクラスタリングが起っていないこともこれを裏付けている。培養 28 日目まで L-Glu に対して反応を示さなかったが、これまで我々が検討してきたラインの中では機能的 L-Glu 受容体の発現が最も遅いラインである。また、L-Glu に反応する細胞も 40% に満たない。一方でこの L-Glu 反応性細胞のほとんどで NMDA 受容体が機能していた。しかし、L-Glu による Ca<sup>2+</sup> 上昇値が非常に小さく、本標本で薬理学的実験が行うことは困難である。我々はすでに、認知機能、神経活動の基盤であるシナプス機能に必須であり、かつ、神経特異的細胞障害の原因となる NMDA 受容体を発現する hiPSC-neuron 細胞 2 ラインを見いだしている。それらに比較して、Repro-Glu の優位性は見いだせない。今後、培養条件等やグリア細胞の活用によって本ラインの改良を加えつつ、新しいラインの開拓、選抜を継続する必要がある。

#### 2. 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の機能促進条件の検討

グリア細胞由来因子の活用により hiPSC-neuron の神経機能発現の促進を試みた。iNeuron 培養 1 日目から neural stem cell が全く存在せず、純粋な Tuj1(+) 神経細胞となっている。従って、神経機能発現を促進する因子のスクリーニングのためには優れた標本と言える。そこで我々は、最近 L-Glu 受容体のリサイクリングに関わ

ることが発見されたグリア細胞由来因子 X を iNeuron に適用した。すると機能的な NMDA 受容体発現が亢進した。また、一細胞あたりの AP-5 の効果も X 処理群ではより強くなっていたことから、細胞当たりの機能的な NMDA 受容体発現量も増加している可能性が高い。この場合の機能的な NMDA 受容体の発現亢進として厳密に何が起こっているかについては検討の必要がある。細胞あたりの NMDA 受容体の発現量増加、NMDA 受容体の細胞膜へのリサイクリングの増加、NMDA 受容体分子への直接的な作用、など現時点では複数のメカニズムを考えることができる。現在 NMDA 受容体発現量、細胞内分布について Western blotting 法によって検討を進めている最中である。NMDA 受容体の安定的な発現が達成されれば、現在動物で行われている興奮毒性試験を hiPSC-neuron に加速的に置き換えることが可能になるだろう。

## E. 結論

### ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 in vitro 医薬品安全性評価法の開発 (白尾)

培養神経細胞を用いた Drebrin-imaging-based evaluation of synapse function (DIBES 法) は医薬品安全性評価へ応用できることが示唆された。また、現状の iNeuron 及び Ripro DA を医薬品安全性評価へ応用するためには、より成熟度を増すための方法を開発することが必須であると考えられた。

### 脳疾患を再現した in vitro 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞等の構造・機能の解析 (池谷)

機能的多ニューロンカルシウムイメージ

ングを用いて、回路の活動を大規模かつ高解像度で観察することにより、以下の点を明らかにした。

- (1) 全体のシナプス伝達量が減弱しても回路の活動量は安定して保たれる
- (2) シナプス伝達強度を減弱させても興奮・抑制のバランスは保たれる
- (3) シナプス伝達強度を減弱させると興奮性細胞の膜抵抗が上昇する
- (4) 細胞外温度を上昇させて興奮性シナプス伝達を過剰に亢進させると、回路の活動は過剰な同期活動を示す。この同期活動は非 NMDA 受容体拮抗薬により抑制される

本研究により、神経回路の自発活動は興奮・抑制のバランスが保たれることで恒常的に維持されることが示唆された。さらに、一度バランスが崩れると、回路の活動が容易に変化することを見出した。本研究で明らかとなった現象が、てんかん等神経異常活動の数値化に応用できるばかりでなく、新たな作用機序のてんかん治療薬である非 NMDA 受容体拮抗薬の作用機序解明の足がかりとなることが期待される。

### グリア細胞を利用した神経回路形成及び多点平面電極システムによる安全性評価試験法の確立 (宮本)

hiPSC-neuron 等の自発性興奮に基づく回路形成成熟度の MEA を用いた数値化に成功し、hiPSC-neuron 等を選抜するための条件が整備できた。また、グリア細胞を用いた hiPSC-neuron 等の機能発現を促進するための基本条件が決定できた。

### 脳神経機能を再現したヒト iPS 細胞由来神経細胞等およびそれを用いた薬理評価系の開発 (佐藤)

Repro-Glu は前脳にむけて分化が進んだ標本であることが示唆されたが、L-Glu への反応が現れるまでに長期間の培養が必要であり、L-Glu 反応性細胞の含有率が低い。培養条件の再検討やグリア細胞の活用により神経機能発現の促進を行う必要がある。一方で、新たなラインの選抜を継続する必要がある。

hiPSC-neuron の機能的 NMDA 受容体発現を亢進するグリア細胞由来因子 X を見いだした。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Xu SQ, Buraschi S, Morcavallo A, Genua M, Shirao T, Stephen C, A novel role for drebrin in regulating progranulin bioactivity in urothelial cancer. *Oncotarget*. in press (2015)
2. Fujieda T, Koganezawa N, Ide Y, Shirao T, Sekino Y, An inhibitory pathway controlling the gating mechanism of the mouse lateral amygdala revealed by voltage-sensitive dye imaging, *Neurosci Lett*, 17;590:126-31 doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.079. Epub 2015 Jan 31.
3. Kudo S, Suzuki Y, Noda SE, Mizui T, Shirai K, Okamoto M, Kaminuma T, Yoshida Y, Shirao T, Nakano T, Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain. *Exp Ther Med*, 8(3):754-758. Epub 2014 Jun 23.
4. Ishizuka Y, Shimizu H, Takagi E, Kato M, Yamagata H, Mikuni M, Shirao T, Histone deacetylase mediates the decrease in drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers. *Neurochem Int*, 6:114-21. doi: 10.1016/j.neuint.2014.07.005. Epub 2014 Jul 21.
5. Ishikawa M, Shiota J, Ishibashi Y, Hakamata T, Shoji S, Fukuchi M, Tsuda M, Shirao T, Sekino Y, Baraban JM, Tabuchi A, Cellular localization and dendritic function of rat isoforms of the SRF coactivator MKL1 in cortical neurons. *Neuroreport*, 25(8):585-92 (2014)
6. 高木夕貴、杉山弘樹、池谷裕二、海馬における記憶再生のメカニズム、*Clin Neurosci*, 33(2), 225-225 (2015)
7. Nakayama D, Iwata H, Teshirogi C, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *J Neurosci*, 5, 819–830 (2015)
8. Nakayama D, Baraki Z, Onoue K, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Frontal association cortex is engaged in stimulus integration during associative learning. *Curr Biol*, 25, 117–123 (2015)
9. Nakae K, Ikegaya Y, Ishikawa T, Oba S, Urakubo H, Koyama M, Ishii S, A statistical method of identifying interactions in neuron–glia systems based on functional multicell calcium imaging. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003949 (2014)
10. Abe R, Sakaguchi T, Kitajo K, Ishikawa, D, Matsumoto N, Matsuki N, Ikegaya Y, Sound-induced modulation of hippocampal  $\theta$  oscillations. *Neuroreport*, 25, 1368-1374 (2014)
11. Okamoto K, Ishikawa T, Abe R, Ishikawa D, Kobayashi C, Mizunuma M, Norimoto H, Matsuki N, Ikegaya Y, Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J Physiol Sci*, 64, 421-431 (2014)
12. Miyawaki T, Norimoto H, Ishikawa T, Watanabe Y, Matsuki N, Ikegaya Y, Dopamine receptor activation reorganizes neuronal ensembles during hippocampal sharp waves in vitro. *PLoS One*, 9, e104438 (2014)
13. Nonaka A, Toyoda T, Miura Y, Hitora-Imamura N, Naka M, Eguchi M,

- Yamaguchi S, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. *J Neurosci*, 34, 9305–9309 (2014)
14. Abe R, Sakaguchi T, Matsumoto N, Matsuki N, Ikegaya Y, Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport*, 25, 1013-1017 (2014)
  15. Onoue K, Nakayama D, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Fear extinction requires Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala. *Mol Brain*, 7, 30 (2014)
  16. Sasaki T, Ishikawa T, Abe R, Nakayama R, Asada A, Matsuki N, Ikegaya Y, Astrocyte calcium signaling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *J Physiol*, 592, 2771-2783 (2014)
  17. Ishikawa D, Matsumoto N, Sakaguchi T, Matsuki N, Ikegaya Y, Operant conditioning of synaptic and spiking activity patterns in single hippocampal neurons. *N Neurosci*, 34, 5044-5053 (2014)
  18. Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y, Interneuron firing precedes sequential activation of neuronal ensembles in hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, 39, 2027-2036 (2014)
  19. Sato K, Microglia effects on neuronal development. *GLIA* (in press ) (C.A.)
  20. Fujimori K, Takaki J, Miura M, Shigemoto-Mogami Y, Sekino Y, Suzuki T, Sato K, Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation, *J Pharamcol Sci* (in press) (C.A.)
  21. Shigemoto-Mogami Y, Fujimori K, Ikarashi Y, Hirose A, Sekino Y, Sato K, Residual metals in carbon nanotubes suppresses the proliferation of neural stem cells. *Fundam Toxicol Sci*, 1(3), 87-94 (2014) (C.A.)
  22. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K, Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci*, 34(5), 2231-2243 (2014) (C.A.)
- ## 2. 学会発表
- <国内学会>
1. 白尾智明、培養神経細胞を用いた中枢神経系に対する薬物有害反応試験法開発への課題、第41回日本毒性学会学術年会(2014. 7) (神戸) (invited シンポジウム「ヒト iPS 細胞由来分化細胞を用いた医薬品安全性評価の課題と現状」)
  2. Ishizuka Y, Shimizu H, Shirao T, Histone deacetylase is involved in the decrease of drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers. 第37回日本神経科学大会 (2014. 9) (横浜)
  3. Shimizu H, Ishizuka Y, Shirao T, Allopregnanolone increases the density of drebrin clusters along dendrite. 第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  4. Puspitasari A, Koganezawa N, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Shirao T, Acute effect of carbon ion irradiation on hippocampal neuronal cell death and fear memory formation. 第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  5. Koganezawa N, Kajita Y, Kojima N, Sakimura K, Shirao T, Primary cultured hippocampal neurons prepared from drebrin knockout mouse shows the decrease of MAP2 positive dendrites at late developmental stage. 第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  6. Roppongi RT, Ohara Y, Koganezawa N, Yamazaki H, Ootsu M, Sato K, Sekino Y, Shirao T, Slow axonal growth in human iPSCs-derived neurons. 第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)



7. Yamazaki H, Shirao T, Spikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin. 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
8. Kajita Y, Kojima N, Sakimura K, Shirao T, Drebrin knockout mice show the olfaction impairment caused by delayed neural exchange in olfactory bulb. 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
9. Yamazaki H, Shirao T, Spikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin. 第 57 回日本神経化学大会 (2014.9)(奈良)(invited in Symposium “A polyhedral approach to molecular bases involved in synaptic plasticity”
10. Koganezawa N, Puspitasari A, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Shirao T. The time-dependent effects of radiation on fear memory and synaptic proteins. 第 57 回日本神経化学大会 (2014.9) (奈良) (invited in Symposium “The dawn of Radiation Neurobiology”
11. Shirao T, Koganezawa N, Kajita Y, Kojima N, Sakimura K. Primary cultured neurons prepared from drebrin knockout mice have a few MAP2 positive dendrites. 第 57 回日本神経化学大会 (2014.9) (奈良)
12. 清水 英雄、石塚 佑太、白尾 智明、アロプレグナロンによるドレブリンクラスターと樹状突起スパイン密度の増加効果、第 131 回日本薬理学会関東部会 (2014.10) (横浜)
13. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、池谷裕二、経験に基づくマウス共感行動の促進、第 15 回脳と心のメカニズム 冬のワークショップ(2015.1) (留寿都)
14. 乗本裕明、水沼未雅、田尾賢太郎、江川堯寛、花岡健二郎、坂口哲也、日置寛之、金子武嗣、山口瞬、長野哲雄、松木則夫、池谷裕二、興奮・抑制バランスの崩れが記憶再生をドライブする、第 15 回脳と心のメカニズム 冬のワークショップ (2015.1) (留寿都)
15. 原宏士朗、野村洋、池谷裕二、聴覚皮質の光遺伝学的抑制によって作られる連合記憶、第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 (2014.11) (名古屋)
16. 浅田晶子、松木則夫、池谷裕二、視覚刺激に対するアストロサイト微細突起のカルシウム応答、第 131 回日本薬理学会関東部会 (2014.10) (横浜)
17. 岡本和樹、石川智愛、阿部麗実、石川大介、小林千晃、水沼未雅、乗本裕明、松木則夫、池谷裕二、培養スライスの神経回路は生体と類似した自発活動を示す、第 131 回日本薬理学会関東部会 (2014.10) (横浜)
18. 柴田和輝、小山隆太、森下皓平、池谷裕二、自閉症モデルマウスにおける海馬苔状線維シナプス競合の不全、第 23 回海馬と高次脳機能学会 (2014.10) (金沢)
19. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の抑制性応答とシータ波共鳴、第 23 回海馬と高次脳機能学会 (2014.10) (金沢)
20. 岩寄諭嗣、坂口哲也、池谷裕二、事前経験による恐怖反応の増強、第 23

- 回海馬と高次脳機能学会 (2014.10)  
(金沢)
21. 周至文、田中謙二、松永茂、伊関峰生、渡辺正勝、松木則夫、池谷裕二、小山隆太、cAMP による軸索分枝と伸長の独立制御、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  22. 松本信圭、乗本裕明、宮脇健行、松木則夫、池谷裕二、海馬鋭波に先行する海馬支脚の神経活動、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  23. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、森下皓平、小山隆太、松木則夫、池谷裕二、恐怖観察系を用いたマウスの共感特性の検討、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  24. 尾上広祐、野村洋、中山大輔、松木則夫、池谷裕二、恐怖記憶の消失は扁桃体基底外側核における Arc/Arg3.1 の発現を必要とする、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  25. 中山大輔、野村洋、岩田浩一、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、記憶の永続化における遅発的な Arc 発現依存的なスパイン除去、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  26. 乗本裕明、池谷裕二、新奇感覚を用いた視覚障がい神経補綴、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  27. 岡本和樹、石川智愛、阿部麗実、石川大介、小林千晃、水沼未雅、乗本裕明、松木則夫、池谷裕二、組織培養系における神経ネットワークの自発活動は生体の活動を反映する、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  28. 三浦友樹、野村洋、今村菜津子、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、恐怖の復元と下辺縁皮質におけるシナプス伝達との関係、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  29. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の過分極応答とシータ波誘導、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  30. 舟山健太、南澤玄樹、松本信圭、番浩志、松木則夫、池谷裕二、遅延性応答による視覚認知の新たな調節機構、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  31. 石川智愛、佐々木拓哉、小林千晃、岡本和樹、松木則夫、池谷裕二、AMPA 受容体を介したシナプス活動の減少に対する神経回路の活動の頑健性、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  32. 池谷裕二、脳と記憶の不思議、第 17 回日本老年行動科学会東京大会 (2014.9) (東京)
  33. 池谷裕二、記憶と海馬、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  34. 今村(人羅)菜津子、野村洋、三浦友樹、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、内側前頭前皮質のドパミンシグナルによる恐怖の復元の制御、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)、2014 年 9 月 11 日
  35. 原宏士朗、野村洋、池谷裕二、ニューロンの抑制による記憶の形成と想起、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
  36. 小林千晃、松木則夫、池谷裕二、抑制性シナプス入力による興奮性シナプス入力の無効化、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)

37. 池谷裕二、小林千晃、高橋直矢、シナプス活動の時空パターン、電気学会 電子・情報・システム部門大会 (2014.9) (松江)
38. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の過分極応答とシータ波調節、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 (2014.8) (大阪)
39. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、池谷裕二、マウス恐怖観察系を用いた共感の調節機構の解明、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 (2014.8) (大阪)
40. 宮本憲優、小島敦子、澤田光平、Characterization of synaptic transmission induced synchronized population bursts of the iPSC-derived neurons. CBI 学会 2014 年大会 (2014.10) (東京)
41. 宮本憲優、ヒト iPSC 細胞応用安全性評価コンソーシアムでの取り組み及び今後の課題、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム (2014.12) (東京)
42. 宮本憲優、小島敦子、澤田光平、Characterization of synaptic transmission induced spontaneous synchronized burst spikes of the iPSC-derived neurons、日本安全性薬理研究会第 6 回学術年会 (2015.2) (東京)
43. Sato K, Microglia enhances oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム (2015.3) (神戸)
44. Sato K, Accumulation of neurogenic microglia in the early postnatal SVZ clarified by a simple stereological imaging method. 第 88 回 日本薬理学会年会シンポジウム (2015.3) (名古屋)
45. 佐藤 薫、高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子、興奮毒性評価が可能なヒト iPSC 細胞由来神経細胞を用いた薬理試験系確立の試み、第 88 回 日本薬理学会年会 (2015.3) (名古屋)
46. 最上 (重本) 由香里、干川 和枝、関野 祐子、佐藤 薫、ミクログリアの活性状態に依存した血液脳関門のバリア機能への影響、日本薬学会第 135 年会 (2015.3) (神戸)
47. 佐藤 薫、高橋華奈子、最上 (重本) 由香里、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子、興奮毒性評価が可能なヒト iPSC 細胞由来神経細胞の探索、日本薬学会 第 135 年会 (2015.3) (神戸)
48. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、中條かおり、干川和枝、金村米博、正札智子、福角勇人、岡田洋平、岡野栄之、白尾智明、関野祐子、佐藤 薫、ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の非臨床試験への応用の試み、第 14 回 日本再生医療学会総会 (2015.3) (横浜)
49. Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y, Okano H, Shirao T, Sekino Y, An attempt to establish neuron-specific

- toxicity evaluation systems using human iPSC-derived neurons. 日本安全性薬理研究会第 6 回学術年会 (2015.2) (東京)
50. Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi Y, Okada Y, Okano H, Shirao T, Sekino Y, An attempt to establish non-clinical experiments for nervous system using human iPSC-derived neurons. The 18th Takeda science foundation symposium on bioscience ‘ iPS Cells for regenerative medicine ’ (2015.1) (Osaka)
  51. 佐藤 薫、安全性薬理試験へのヒト iPS 細胞由来神経細胞の応用—神経特異的影響評価の可能性と課題、第 11 回 医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラムヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現にむけて (2014.12) (東京)
  52. 佐藤 薫、hiPSC 由来神経細胞に期待すること—医薬品開発における実用のために、CBI 学会 2014 年大会 Focused session 「In vitro 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞間の「シナプス形成不全」解決にむけて— Human neuronal circuitry on dish は実現できるのか」(オーガナイザー) (2014.10) (東京)
  53. Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Ohtsu K, Okada Y, Okano H, Sekino Y, Sato K, Establishment of neuron-specific toxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons. CBI 学会 2014 年大会 (2014.10) (東京)
  54. Sato K, Shigemoto-Mogami, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Discovery of the population of activated microglia which enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
  55. Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Ohtsu K, Okada Y, Okano H, Sekino Y, Sato K, Application of human induced pluripotent stem cell-derived neurons to the neurotoxicity evaluation system. Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
  56. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sekino Y, Sato K, Development of in vitro blood-brain barrier model including microglia. Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
  57. Kasahara Y, Fujimori K, Miura M, Mogami Y, Sekino Y, Sato K, Suzuki T, Comparison of the effects of antidepressants on the microglial activation in LPS-inflammation model. Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
  58. Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Ohtsu K, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y, Okano H, Sekino Y, An attempt to apply human induced pluripotent stem cell-derived neurons to the excitotoxicity evaluation system. 第 36 回 日本生物学的精神医学会・第 57 回 日本神経化学会大会合同大会 (2014.9) (奈良)
  59. Otsu M, Yamazaki H, Roppongi RI, Koganezawa N, Ohara Y, Sato K,

- Sekino Y, Shirao T, Application of human iPSC-derived neurons at early developmental stages for drug discovery. 第 36 回 日本生物学的精神医学会・第 57 回 日本神経化学学会大会合同大会 (2014.9, 奈良)
60. 佐藤 薫、薬はどのようにして作られるか、群馬大学医学部応用基礎医学講義 (2014.9) (前橋)
  61. 佐藤 薫、ヒト iPSC 細胞由来神経細胞による神経特異的有害反応予測の試み、実中研セミナー (2014.9) (川崎)
  62. 佐藤 薫、ヒト iPSC 細胞由来神経細胞は神経特異的有害反応を予測できるか、第 41 回 日本毒性学会学術年会シンポジウム (2014.7) (神戸)
  63. 佐藤 薫、「健康な脳を守る」ための厚労研究—グリア細胞からヒト iPSC 細胞まで」、熊本大学大学院「分子薬効学特論」「医療薬科学特論」講義 (2014.6) (熊本)
  64. 佐藤 薫、ヒト iPSC 細胞由来神経細胞によるヒト神経有害反応予測系の構築、PMDA 講演 (2014.4) (東京)
- <国際学会>
1. Shirao T, Drebrin and its function. (Keynote lecture) The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  2. Shimizu H, Ishizuka Y, Shirao T, Allopregnanolone increases the density of drebrin clusters along dendrite. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  3. Ishizuka Y, Shimizu H, Shirao T, Amyloid beta oligomers induce drebrin exodus from dendritic spines via histone deacetylase activation. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  4. Puspitasari A, Koganezawa N, Shuchuan M, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Kanai T, Shirao T, Acute effect of Carbon Ion Irradiation on hippocampal neuron and fear memory formation. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  5. Roppongi RT, Shirao T, 5-HT<sub>2A</sub> receptor activity induces the disappearance of drebrin from dendritic spines in NMDA receptor dependent manner. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  6. Koganezawa N, Shimizu H, Shirao T, Nanoscale organization of an actin-binding protein, drebrin. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  7. Kajita Y, Yamazaki H, Koganezawa N, Shirao T, Drebrin A overexpression causes structural change of microtubule via F-actin modification in cultured fibroblast. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  8. Yamazaki H, Shirao T, Spikar function and its stabilization in dendritic spines are dependent on drebrin. The 6th ISN Special Conference, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  9. Shirao T, Drebrin as a surrogate marker of synaptic maturation. ISN Satellite Symposium “Key molecules for neuronal maturation -Application for validating the maturation of human iPSC-derived neurons -”, (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  10. Shirao T, Ishizuka Y, Shimizu H, Sekino Y, Search for the anti-amyloid beta drugs using primary neuronal cultures with drebrin cluster density as a marker of synaptic function. Safety Pharmacology Society 14<sup>th</sup> Annual Meeting, (2014. 10) (Washington DC, USA)
  11. Sekino Y, Ootsu M, Ohara Y, Yamazaki H, Sato K, Roppongi RT, Koganezawa N, Shirao T, Effects of valproic acid and astemizole on the neurite growth of human iPSCs-derived neurons. Safety

- Pharmacology Society 14<sup>th</sup> Annual Meeting, (2014. 10) (Washington DC, USA)
12. Shirao T, Mizui T, Koganezawa N, Shimizu H, Yasuda H, Sekino Y, Myosin II ATPase activity mediates the biphasic movement of stable F-actin bound by drebrin A between dendritic spines and the parent dendrite in long-term potentiation. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (2014. 11) (Washington DC, USA)
  13. Yamazaki H, Shirao T, Spikar, a novel transcriptional coactivator, regulates the formation and stabilization of dendritic spines dependent on drebrin. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (2014. 11) (Washington DC, USA)
  14. Koganezawa N, Ohara Y, Yamazaki H, Roppongi RT, Sato K, Sekino Y, Shirao T, Axonal polarity formation in human iPSCs-derived neurons. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (2014. 11) (Washington DC, USA)
  15. Puspitasari A, Koganezawa N, Kojima N, Isono M, Yoshida Y, Shirao T, Acute effect of X-irradiation and carbon ion-irradiation on fear memory formation and its underlying mechanism. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (2014. 11) (Washington DC, USA)
  16. Okamoto K, Ishikawa T, Abe R, Ishikawa, D, Kobayashi C, Mizunuma M, Norimoto, H, Matsuki Y, Ikegaya Y, Organotypically cultured hippocampal networks emit spontaneous neuronal activity similar to in vivo ongoing activity. SfN2014 (2014.11) (Washington D.C., USA)
  17. Ikegaya Y, Sakaguchi T, Okamoto K, Abe, R, Morishita K, Koyama R, Matsuki N, Empathetic behavior in fear observation of mice. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2014. 7) (Capetown, South Africa)
  18. Ikegaya Y, Pathophysiology of neuro-glio-vascular dynamics. Symposium: New Approaches for Non-neuronal Brain Diseases, 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2014.7) (Capetown, South Africa)
  19. Miyamoto N, Ojima A, Sawada K, Characterization of synaptic transmission induced synchronized population bursts of the iPSC-derived neurons. The 3rd Annual CDI UGM (2014.8) (Boston, USA)
  20. Miyamoto N, The application of iPSC-derived differentiated cells for drug safety evaluation. ISN satellite symposium (2014. 9) (Tokyo, Japan)
  21. Miyamoto N, Ojima A, Sawada K, Characterization of synaptic transmission induced synchronized population bursts of the iPSC-derived neurons. (2015. 1) The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (Osaka, Japan)
  22. Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sekino Y, Microglia accelerates the maturation of barrier function of blood brain barrier. SfN2014 (2014.11) (Washington D.C., USA)
  23. Sato K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Ohtsu K, Kanemura Y, Shofuda T, Fukusumi H, Okada Y, Okano H, Shirao T, Sekino Y, Sato K, Search for the human induced pluripotent stem cell-derived neurons capable of detecting the CNS-specific toxicity. SPS 14th annual meeting (2014.10) (Washington D.C., USA)
  24. Sato K, Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. Dept Cell Biol Anat Seminar, New York medical college (2014.10) (Varhara, USA)
  25. Sato K, Sequential expression of various receptors along with the differentiation of human iPSC-derived neurons. ISN satellite symposium (2014,9) (Tokyo, Japan)
  26. Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y,

The discovery of a population of microglia which enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ. 9th FENS forum of neuroscience (2014.7) (Milan, Italy)

発明の名称：ドレブリン A およびドレブリン E の特異的定量法

出願人：群馬大学

出願日：平成 26 年 8 月 13 日

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得

特願 2014-164695

発明者：白尾智明、石塚佑太、山崎博幸

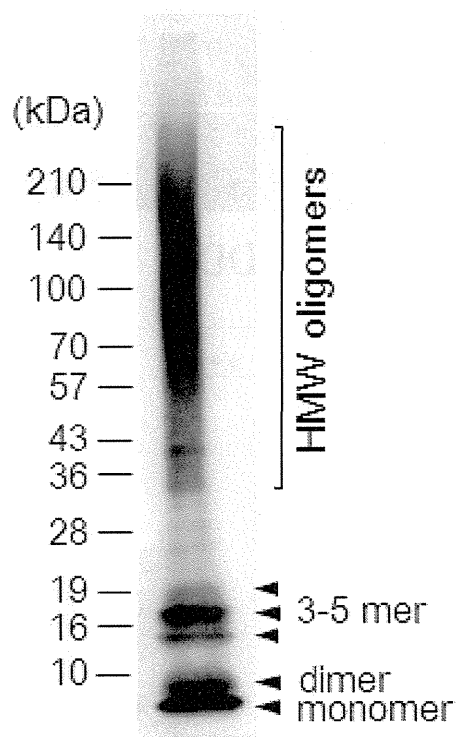
該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

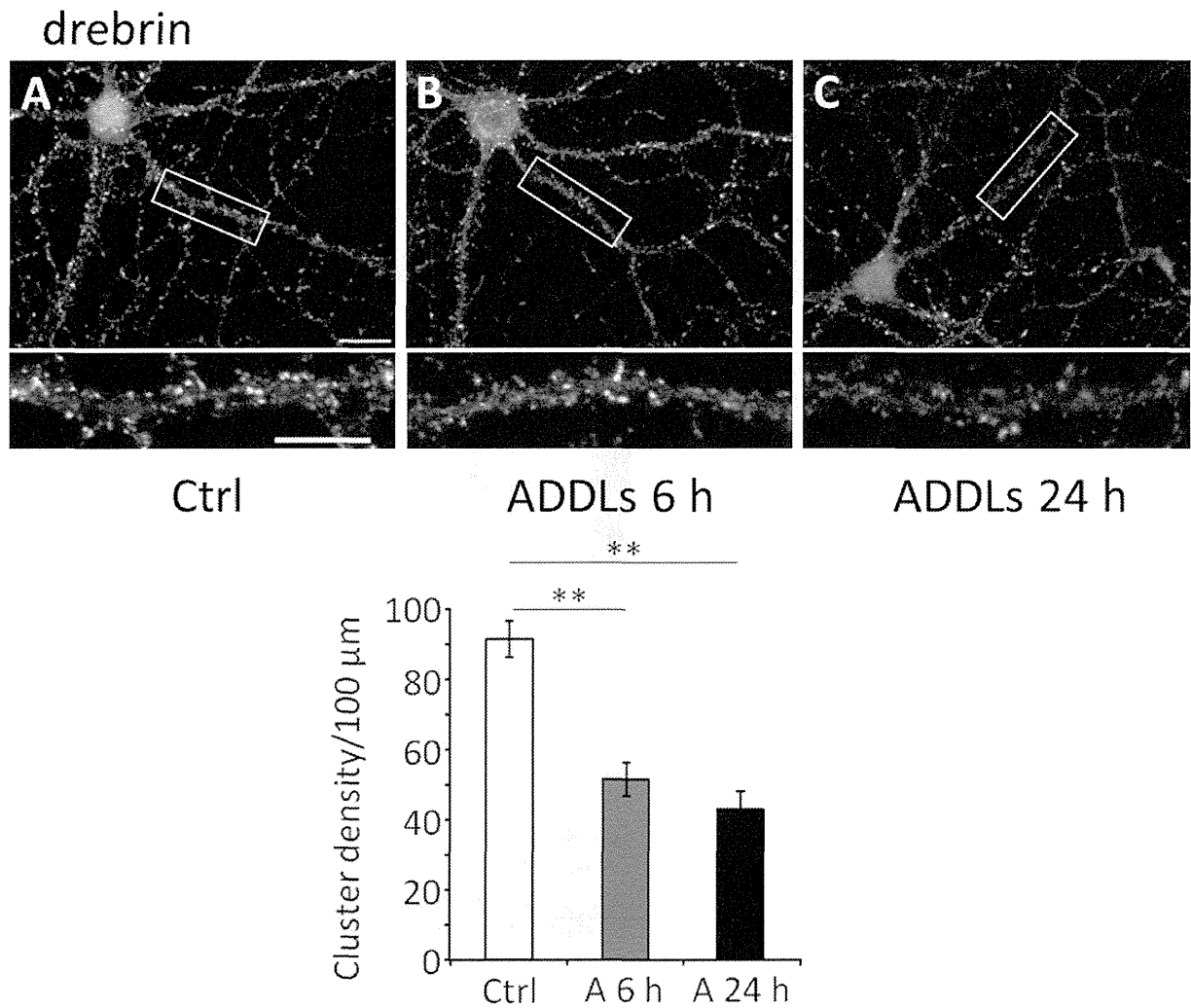
# Figure 1



**Fig. 1 Western blot analysis of ADDLs.** Closed arrowheads show the monomeric to pentameric forms. The broad smear represents high molecular weight (HMW) oligomers (indicated by the bracket).

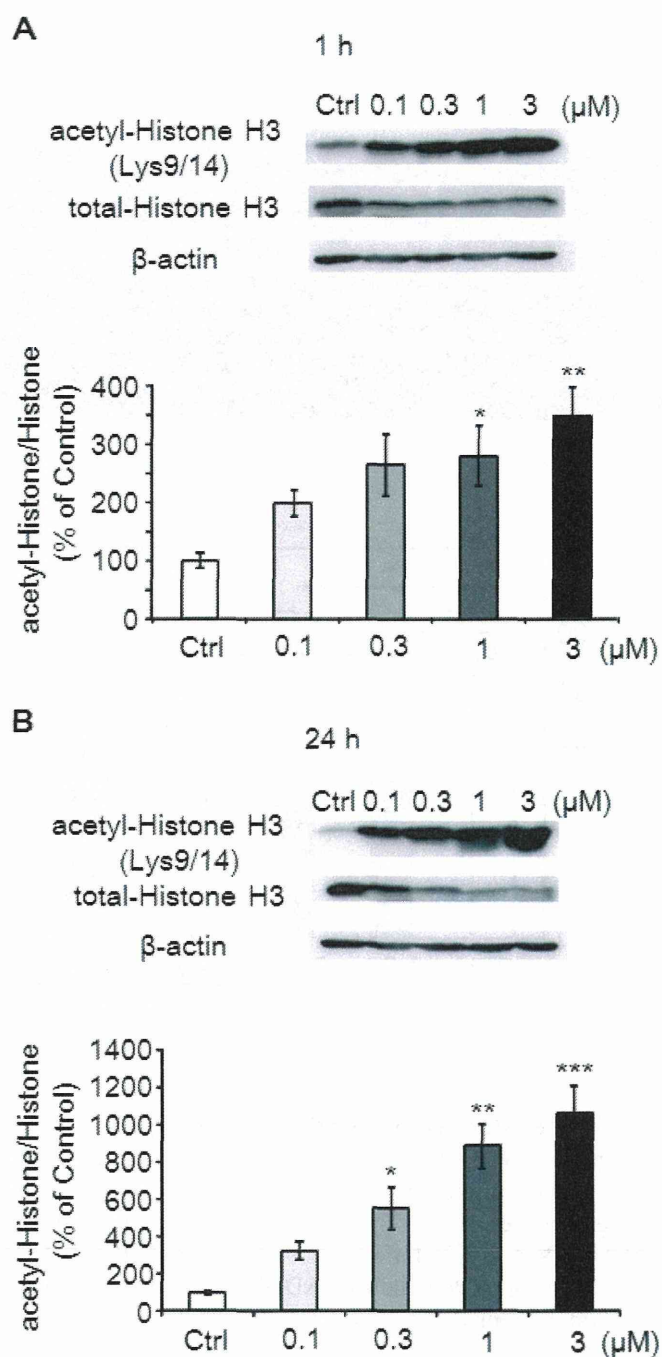


## Figure 2



**Fig. 2 ADDLs reduce drebrin cluster density.** Cultured neurons were treated with 100 nM ADDLs for 6 and 24 h. Immunofluorescence images of drebrin (A-C). Quantification of drebrin cluster density along dendrites. Data are presented as means  $\pm$  SEM;  $n=35$  cells for control, ADDLs 6 h, ADDLs 24 h;  $**P < 0.01$ , ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test. A 6 h and A 24 h indicate ADDL treatments of 6 and 24 h, respectively. Scale bars: low magnification images, 20  $\mu\text{m}$ ; high magnification images, 10  $\mu\text{m}$ .

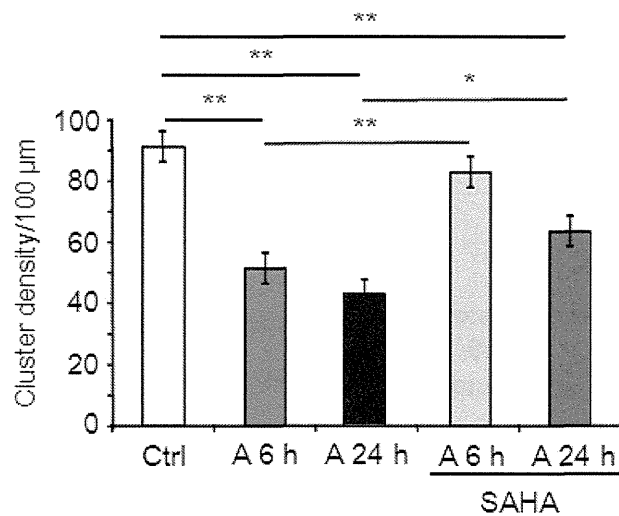
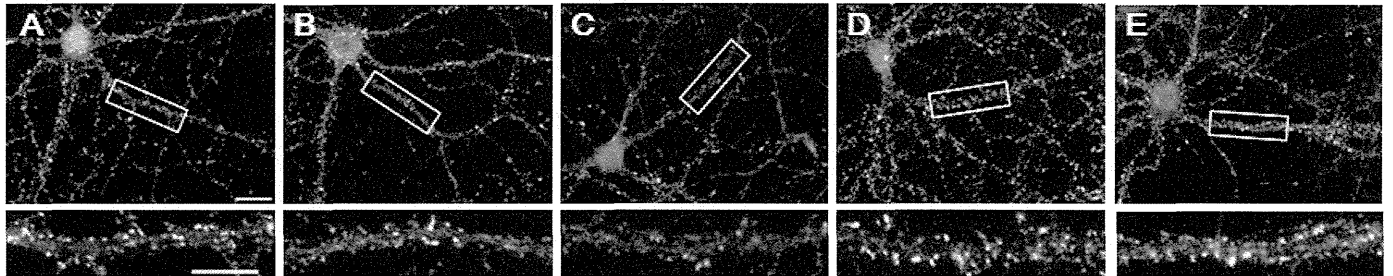
## Figure 3



**Fig. 3 Effect of SAHA on the acetylation of histone H3 protein assessed with western blot analysis.** Cultured neurons were treated with various dosages of SAHA (0.1, 0.3, 1, 3  $\mu\text{M}$ ) for 1 h (A) and 24 h (B). Top panels show typical western blots of histone H3 protein acetylated at Lys9 and 14. Middle panels show typical western blots of total histone H3 protein. Bottom panels show  $\beta$ -actin as loading control. Western blots were quantified with NIH ImageJ software after standardizing the ratio of acetyl/total histone H3 protein. Data are presented as means  $\pm$  SEM,  $n = 3$  experiments; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control, ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test.

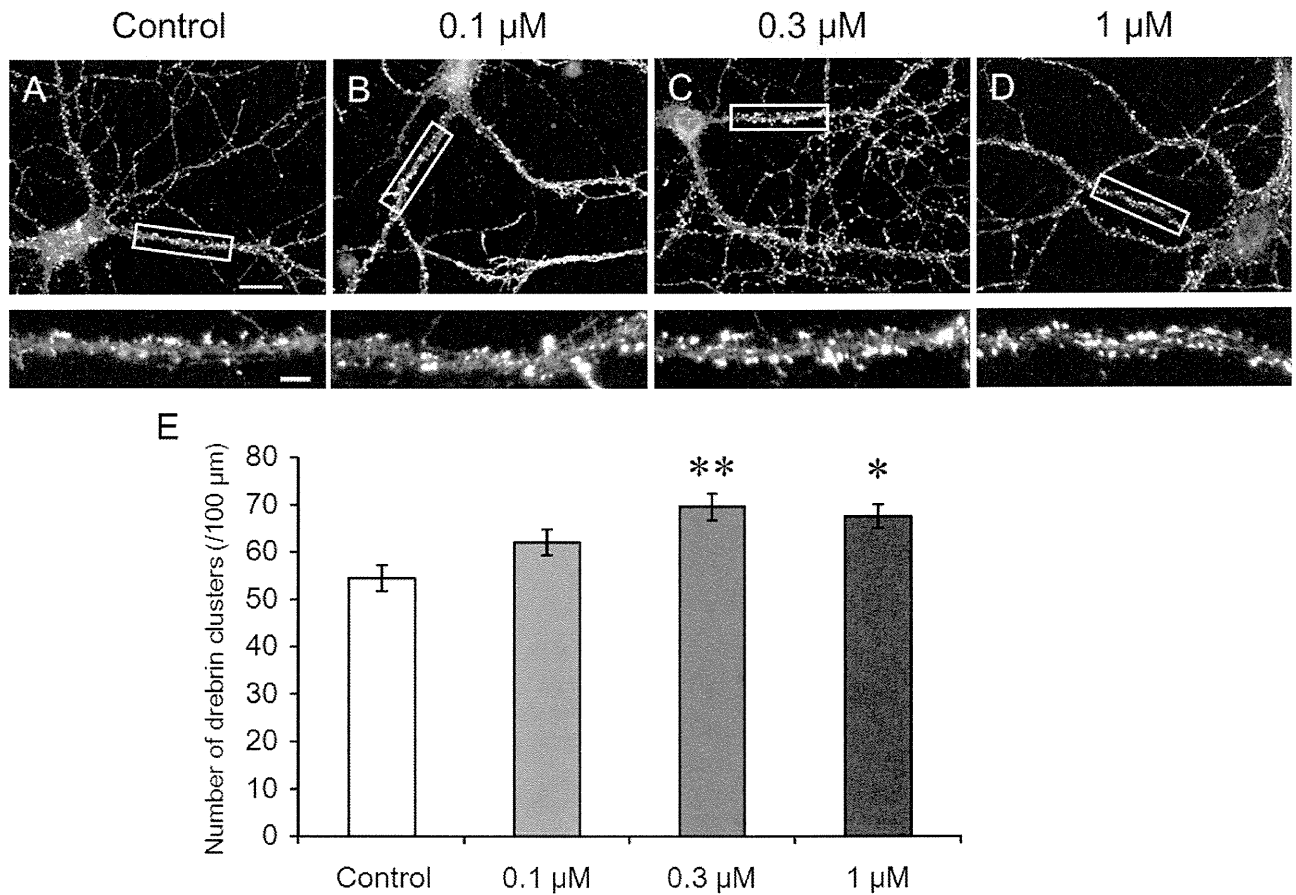
## Figure 4

drebrin



**Fig. 4 Effect of SAHA on drebrin cluster density in ADDL-treated neurons.** Cultured neurons were treated with 1  $\mu\text{M}$  SAHA for 1 h prior to treatment with 100 nM ADDLs for 6 and 24 h. Immunofluorescence images of drebrin (A–E). Lower images are high magnification images of the area in the rectangle in the upper images. Quantification of drebrin cluster density along dendrites. Data are presented as means  $\pm$  SEM;  $n = 35$  cells for control, ADDLs 6 h, ADDLs 24 h, SAHA + ADDLs 24 h;  $n = 34$  for SAHA + ADDLs 6 h;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test. A 6 h and A 24 h indicate ADDL treatments of 6 and 24 h, respectively. Scale bars: low magnification images, 20  $\mu\text{m}$ ; high magnification images, 10  $\mu\text{m}$ .

## Figure 5



**Fig. 5 Effect of AP $\alpha$  on drebrin cluster density along dendrites. Cultured neurons were treated with 0.1, 0.3 and 1  $\mu$ M AP $\alpha$  for 24 h. (A–D) Fluorescence images of cultured neurons immunostained against drebrin. Images below are higher magnification images of the area highlighted by the white rectangles in the above images. Scale bars: low magnification images, 20  $\mu$ m; high magnification images, 5  $\mu$ m. (E) Quantification of drebrin cluster density along dendrites. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM;  $n = 89$  cells for control, 0.1 and 1  $\mu$ M AP $\alpha$ ,  $n = 90$  cells for 0.3  $\mu$ M AP $\alpha$ , \* $p < 0.005$ ; \*\* $p < 0.001$  vs. control, one-way ANOVA, followed by Tukey–Kramer’s post hoc test.**