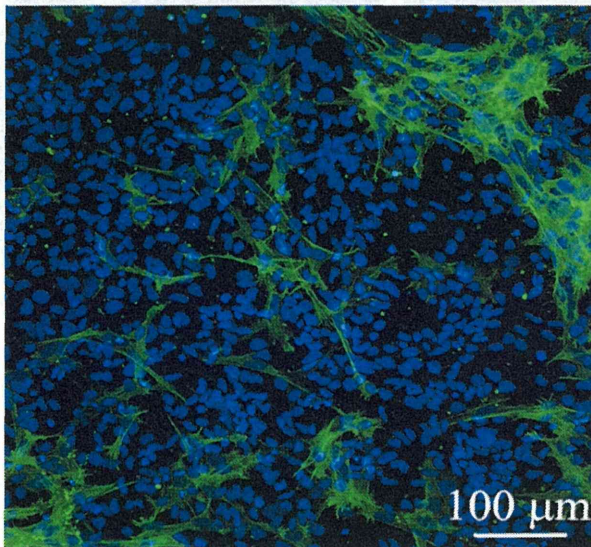


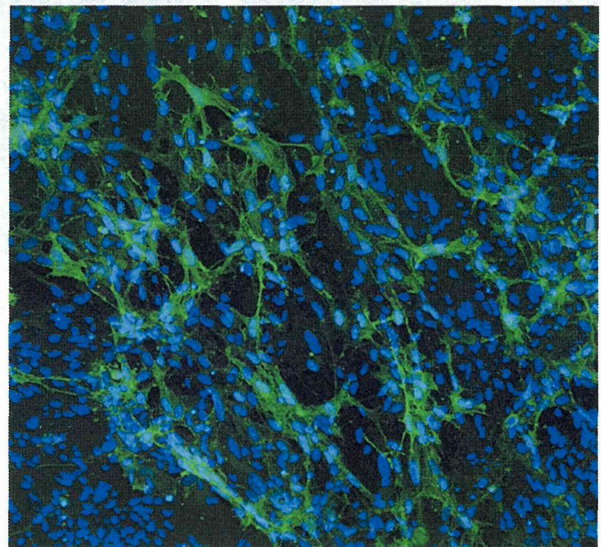
## Figure 26

### Day 14, 35 $\alpha$ -sm1 Hoechst

Day 14



Day 35

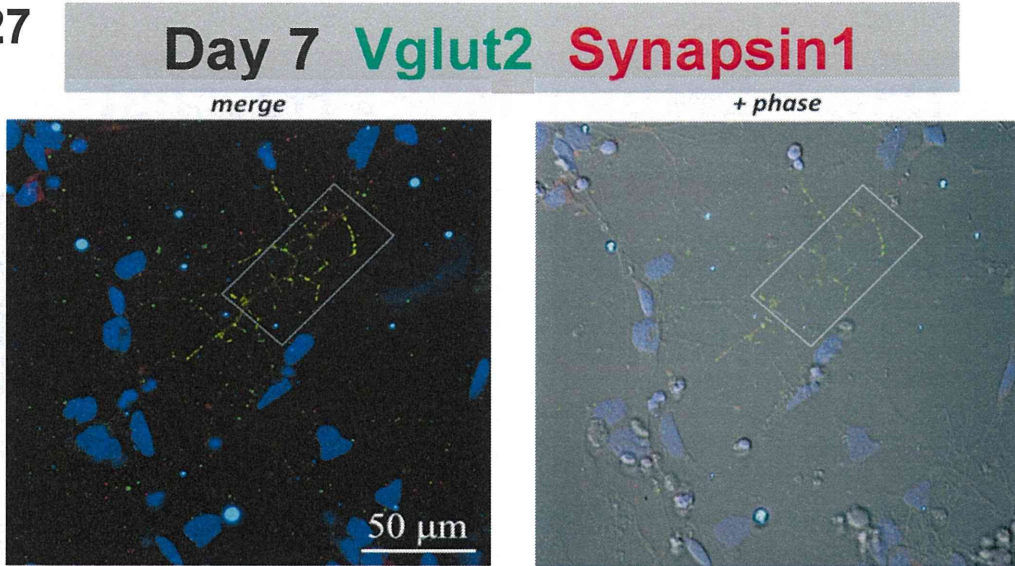


✓ Well, 全体的に発現

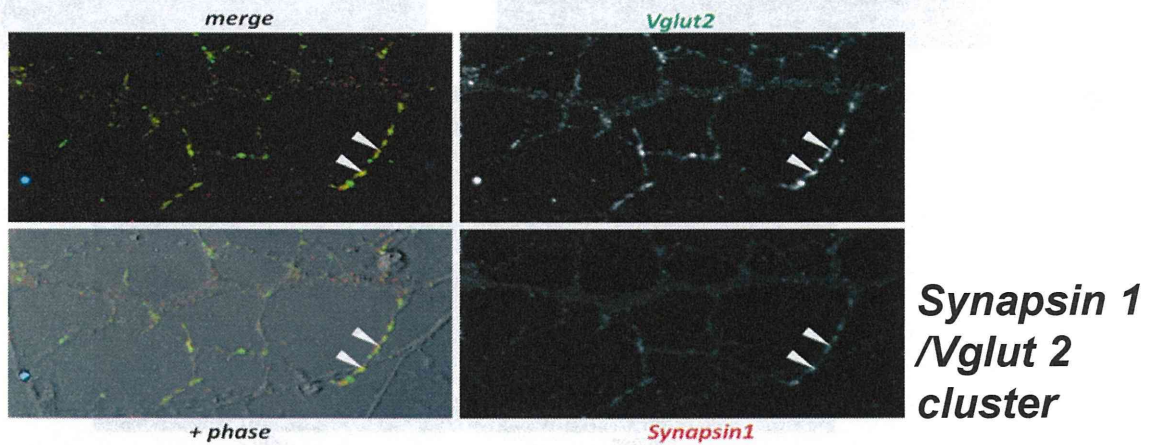
**Fig. 26** Smooth muscle cells are included in Repro-Glu  
At 14 DIV,  $\alpha$ -sm1(+) cells were detected over the entire surface of the well. The number of  $\alpha$ -sm1(+) cells increased with culture period.

Figure 27

A



B



C

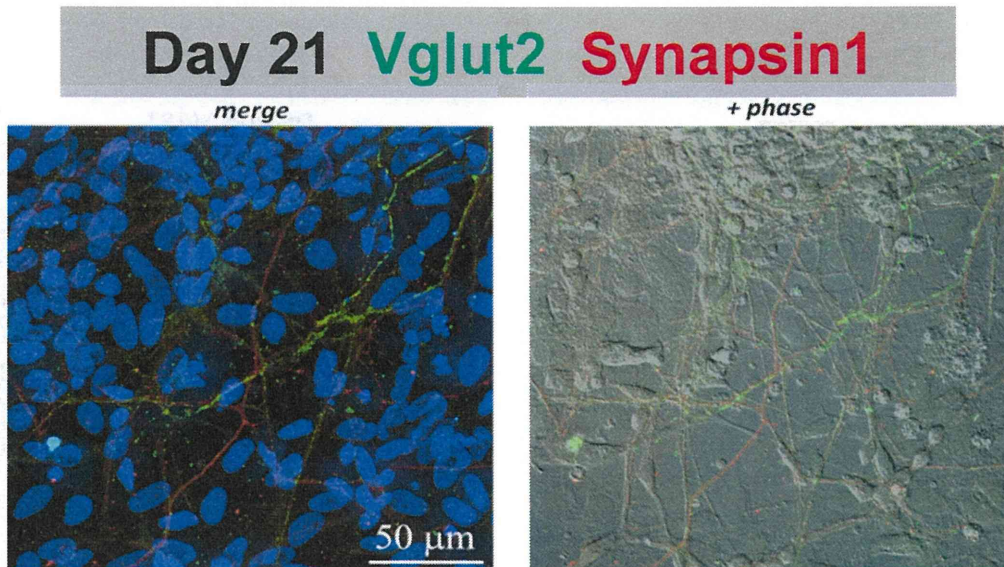
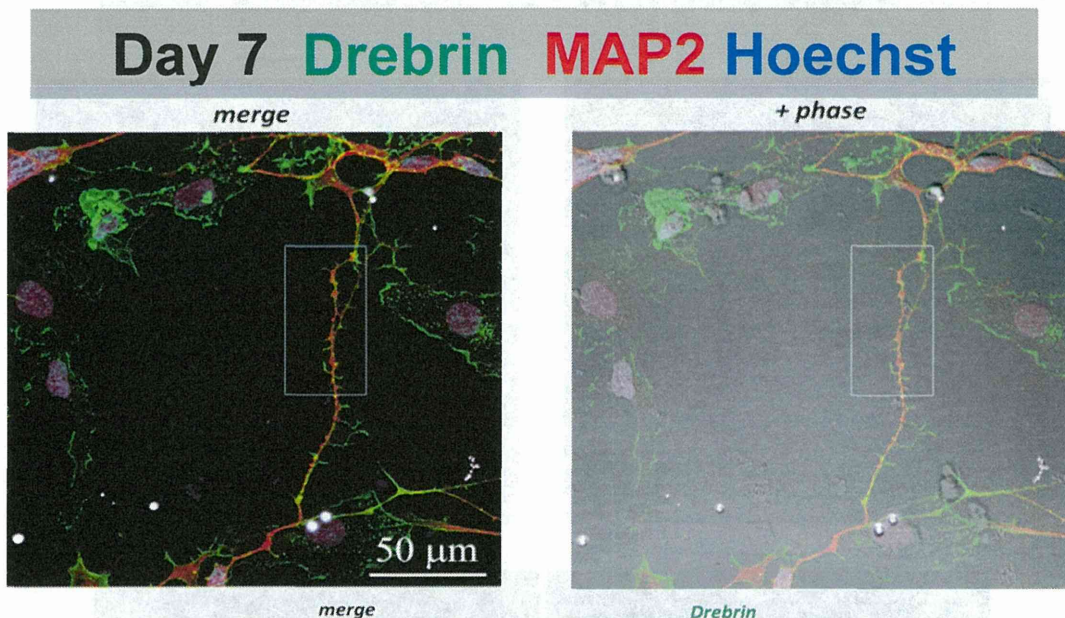


Fig. 27 Presynaptic maturation of Repro-Glu

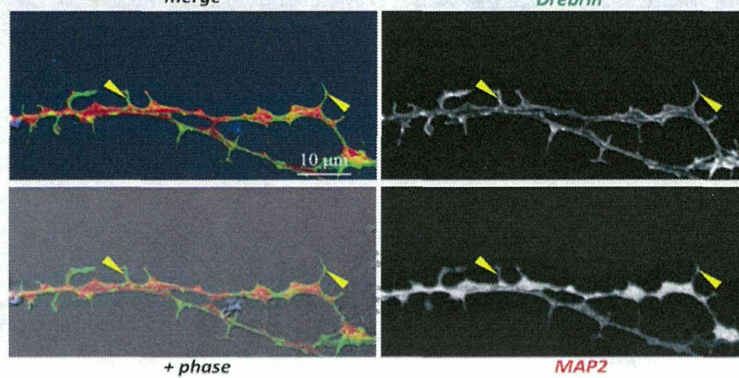
- A. W-staining of Vglut2 and synapsin1 (left) and the merged image with phase-contrast image.
- B. Magnified images of the inset in A. Co-localization of synapsin1 and Vglut2 was clearly observed.
- C. Co-localization of synapsin1 and Vglut2 was also observed at 21 DIV, however, it became difficult to get the image of the isolated neurites owing the high cell density.

Figure 28

A



B



C

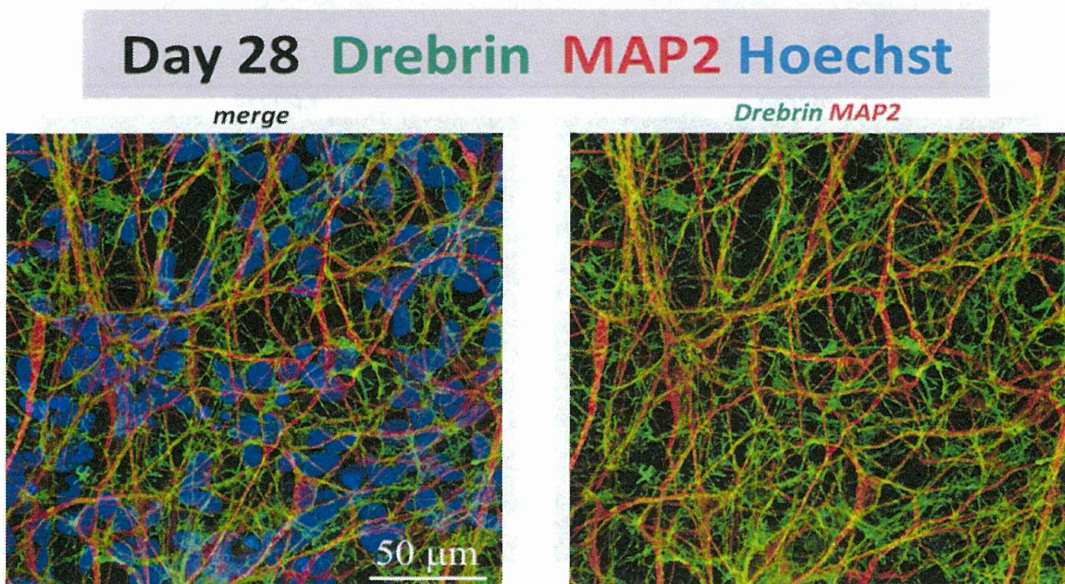
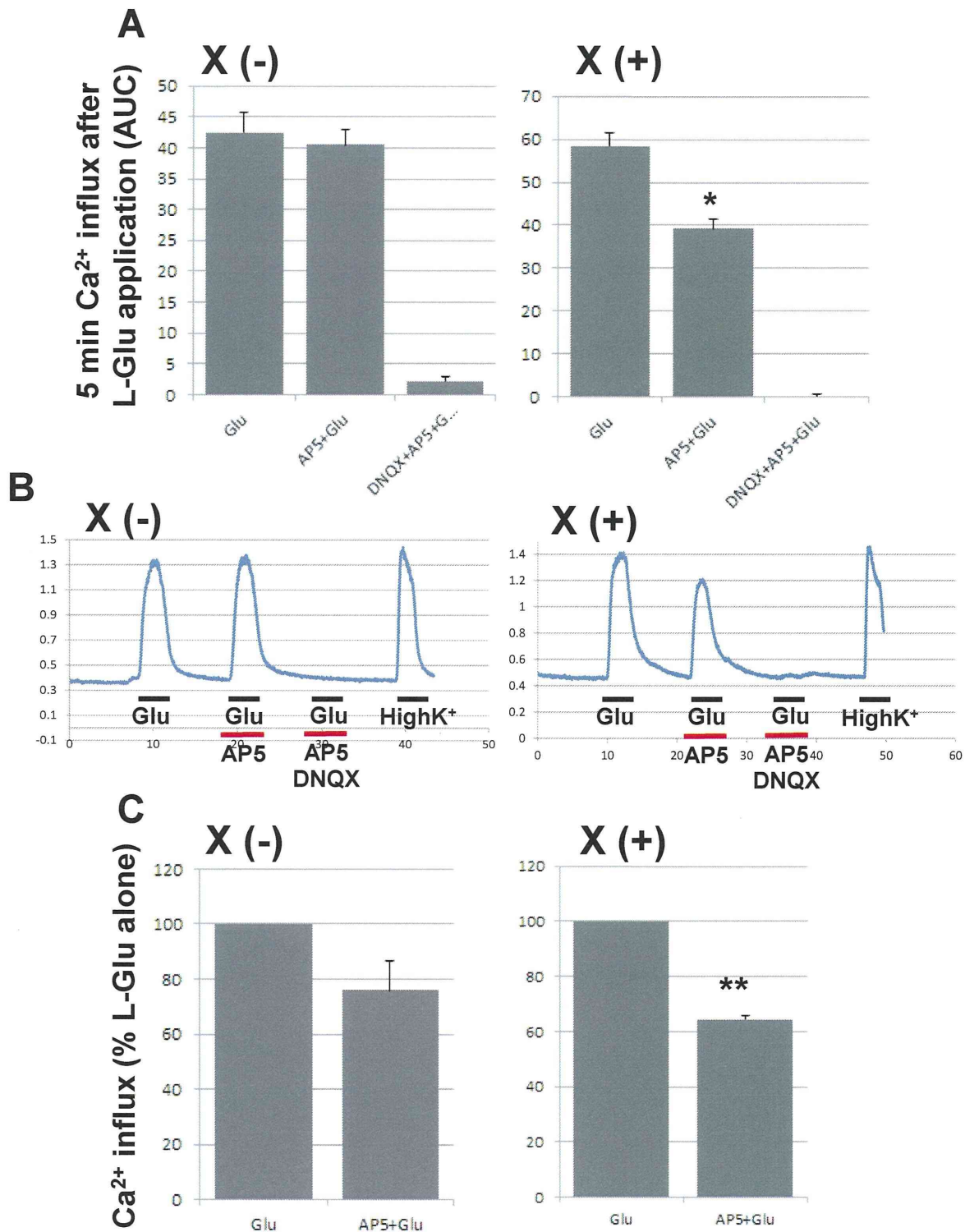


Fig. 28 The extent of postsynaptic maturation of Repro-Glu  
A. W-staining of MAP2 and drebrin and the merged image with phase-contrast image.  
B. Magnified images of the inset in A. Drebrin(+) dendritic filopodia was observed on the MAP2(+) dendrite.  
C. MAP2-independent drebrin signals were observed at 21 DIV.

**Figure 29**



**Fig. 29** Effects of X on the functional expression of NMDA receptors in iNeurons.

**A.** In the X(+) group (4 day-treatment), AP-5 significantly suppressed L-Glu induced Ca<sup>2+</sup> influx, while AP-5 had no effects in the X(-) group.

**B.** Typical traces of the L-Glu-induced Ca<sup>2+</sup> influx in the pharmacological tests.

**C.** The comparison of the effect of AP-5 on Ca<sup>2+</sup> influx in the cells which were responsive to AP-5.

\*\* : 0.01, \* : p<0.05 vs L-Glu-treated group, Student's *t* test. Error bars represent s.e.m.

# 平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

## 医薬品等規制調和・評価研究事業

### II. 委託業務成果報告（業務項目）

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

業務主任者又は担当責任者 白尾 智明

国立大学法人群馬大学 大学院医学系研究科医科学専攻 教授

**研究要旨**

本研究事業は、認知機能障害、神経異常活動を in vitro で数値化する指標を確立し、これを用いてヒト iPS 細胞由来神経細胞（以下、hiPSC-neuron）等を用いた、再現性の良い医薬品の in vitro 安全性評価法を開発することを目的とした。そのために、マウスの初代培養神経細胞に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を示した。薬理試験法に関しては、ドレブリン各アイソフォームの ELISA による定量的測定法を開発し、ng/ml のオーダーで測定できる様になった。以上の結果、DIBES 法を用いることにより、再現性の良い医薬品の in vitro 安全性評価法を開発できることが示唆された。

**研究協力者**

国立大学法人群馬大学 大学院医学系研究  
科医科学専攻

山崎博幸

石塚佑太

小金澤紀子

六本木麗子

清水英雄

国立大学法人群馬大学 大学院医学系研究  
科生命医科学専攻

大津真生

**A. 研究目的**

本研究事業は、認知機能障害、神経異常活動を in vitro で数値化する指標を確立し、これを用いてヒト iPS 細胞由来神経細胞

（以下、hiPSC-neuron）等を用いた、再現性の良い医薬品の in vitro 安全性評価法を開発することを目的とした。

**B. 研究方法**

グリア細胞培養

生後 1 日の新生ラット大脳皮質を単離し、0.25 %トリプシン、0.1 % DNase I を含んだ Hank' s balanced salt solution (HBSS)で、37 °Cで 15 分間インキュベート後、パスツールピペットで適度に組織を分散させ、Fetal bovine serum (FBS)を加えた。その後、細胞溶液をレンズペーパーでろ過し、10 % FBS を含んだ Minimum essential medium (MEM) 培養液を用いて、75 ml 培養フラスコ (PRIMARIA ; FALCON, Franklin Lakes, NJ)で 37 °C、0.5 % CO<sub>2</sub> で培養した。細胞密度がコンフルエントな状態になるまで 10 % FBS を含んだ MEM で、1 週間に 2 度

培地交換をし培養した。その後、HBSS で1度洗浄し、トリプシン処理を行い細胞を回収し、FBS を加え遠心分離機にかけた後、上澄みを取り除き、培養液で懸濁した。あらかじめ凍結用培養液が 500  $\mu$ l 入ったセラムチューブ(住友ベークライト, Tokyo)に、細胞懸濁液を 500  $\mu$ l 加えて、凍結した。ヒト iPS 由来神経細胞の培養 2 週間前に、前述の凍結大脳皮質グリア細胞を解凍し、60 mm 細胞培養ディッシュ (PRIMARIA ; FALCON)に蒔き直し、細胞の密度が 60~70%の状態になるまでで培養した。このグリアシートをマウス海馬神経細胞およびヒト iPS 神経細胞との共培養に使用した。

#### マウス海馬神経細胞初代培養法

胎生 16 日のマウス脳から海馬を取り出し、0.25%トリプシンを含んだ 5 ml の HBSS で 37 度、10 分間インキュベートする。トリプシン処理後、上清を除去し、HBSS 5ml を加えて 37 度、5 分インキュベートする (2 回繰り返す)。HBSS による 2 回のインキュベーション後、上清を除去し、HBSS を 5 ml 加える。組織の分散は以下の 2 種類のパスツールピペットを用いて行う (A: ガスバーナーによる若干の熱処理により先端部の角を丸くしたパスツールピペット, B: ガスバーナーで先端を細くした分散用パスツールピペット)。まず、A で組織をピペッティングにより分散し (10 回)、続いて B でピペッティングし (5 回)、細胞懸濁液とする。培養前日に 9 cm ペトリディッシュにあらかじめ 1 mg/ml Poly-L-lysine でコートしたカバースリップ (18 mm 丸型 ; MATSUNAMI, Osaka) を 16 枚置き、10% FBS 入り MEM (Plating MEM) を入れておいたものに細胞密度 10,000 個/cm<sup>2</sup>になるように細胞懸濁液を添加する。3 時間後、細

胞が付着しているカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、神経細胞が対面するようにセットし 35.8 度で共培養を開始した。細胞維持用培養液は B27 supplement (Life Technologies)を含んだ無血清 MEM を使用した (6 ml)。培養 7 日目、14 日目に 1/3 量の培地交換を行った。

#### iCell Neurons 培養

本研究ではヒト iPS 神経細胞として iCell Neurons (Cellular Dynamics International Inc., Madison, WI)を用いた。iCell Neurons は、CDI 社のプロトコールに従い、iCell Neurons Maintenance Medium (Cellular Dynamics International Inc., WI)を用いて解凍した。その後、あらかじめ 1 mg/ml Poly-L-lysine をコートしたカバースリップ (15 mm 丸型 ; MATSUNAMI, Osaka)上に細胞密度 7000 個/cm<sup>2</sup>で播種した。3 時間後、細胞が付着しているカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、神経細胞が対面するようにセットし共培養を開始した。細胞維持用培養液は B27 supplement を含んだ MEM を使用した。

#### アミロイド $\beta$ オリゴマー (ADDL) の作成

ヒトアミロイド  $\beta$  プロテイン (Peptide Institute, Inc., Osaka) 0.5 mg を室温に 30 分置く (平衡化)。ドラフト内で、氷で冷やした HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-Propanol)で 1 mM にし、ボルテックスにより懸濁する。テフロンプラグのガラスシリンジでタンパク質低吸着 1.5 ml チューブに移し、パラフィルムで封をし、アミロイド  $\beta$  /HFIP 溶液を 2 時間室温でインキュベートする (モノマー化)。チューブの蓋を開け、バキューム遠心 (800g、室

温) でチューブの底に透明のフィルム状のアミロイドβタンパク質が見えるまで遠心する。フィルム状のアミロイドβに DMSO (Dimethyl sulfoxide) を添加し、5 mM のアミロイドβ溶液とし、10 分間の超音波処理で再懸濁する。0.1 M リン酸緩衝液を加えて 100 μM 溶液とし、4 度で 24 時間インキュベートする (オリゴマー化)。遠心で不溶化物を取り除き、アミロイドβオリゴマー (ADDL) とした。

#### cDNA のトランスフェクション法

cDNA のトランスフェクションは培養 7 日目に行った。カバースリップ 5 枚にトランスフェクションする場合、MEM 100 μl に Lipofectamin 2000 (Life technologies) 溶液を 4 μl 添加、同じく MEM に pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo, CA, USA) を 3 μg 分添加し、5 分室温インキュベートした後に混合し、20 分間室温インキュベートする。グリアとの共培養から神経細胞が播種してあるカバースリップを取り出し、カバースリップの細胞播種面を上にし、培養 7 日目の培地交換時に採取した培地を 460 μl のせる。そこに上記 Lipofectamine 2000 混合液を 40 μl 添加し、1 時間 35.8 度でインキュベートした後、グリアとの共培養を再開した。

#### ウェスタンブロット法 (アセチル化の測定を含む)

500 μl の TBS (Tris-buffered saline, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテルを含む) を用いて一つの実験群につき 10 枚のカバースリップから細胞を 1.5 ml チューブへ回収した。遠心により、細胞を沈殿させ、上清を除去した後、100 μl の細胞溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% SDS, 20 mM NaF, 1 mM

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテル含む) を加え、超音波処理によりタンパク質を可溶化した。タンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により決定した。次に、サンプルを等量 (10-20 μg) 使用し、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルを Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore) にトランスブロットセル (Bio-Rad Laboratories) を用いて転写し、10% BSA/TBS (0.05% tween-20 含む) でブロッキング後、適切な一次抗体、二次抗体とインキュベーションし、化学発光にてシグナルの検出を行った (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Milipore)。ADDL の確認においてはオリゴマー化後のサンプルを SDS-PAGE にかけて、上記と同様に転写し、ウェスタンブロットティングを行った。

#### 一次抗体

抗アセチルヒストン H3 抗体 Lys9/14 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)、抗ヒストン H3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗βアクチン抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗アミロイドβタンパク質 1-16 (クローン 6E10, Covance Inc., Princeton, NJ, USA)

#### 二次抗体

HRP (horseradish peroxidase)-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.)

#### 免疫細胞化学

神経細胞を 4 % Paraformaldehyde、0.1 % Glutaraldehyde (0.1 M リン酸緩衝液) で、



15 分間固定した。生理食塩水(PBS)で 2 回洗浄した後、0.1 % Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し、さらに PBS で 2 回洗浄した。次に 3 % Bovine serum albumin を含む PBS (PBSA)で 1 時間ブロッキング処理を行い、PBSA で希釈した一次抗体を 4 °Cで一晩反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、水溶性封入剤(PermaFluor ; Thermo, CA) で封入した。

### 画像取得・解析法

細胞の画像は蛍光顕微鏡(Axio Imager 2, Zeiss, Jena, Germany)を用いて、Meta Morph software (Meta Imaging software Version 7.7; Universal Imaging, West Chester, PA)により取得し、同 software を使って解析を行った。ドレブリンのクラスターを測定するために、培養神経細胞を抗ドレブリン抗体、および細胞体・樹状突起が観察できる Rhodamine-Phalloidine (F-actin)で染色する。F-actin 染色画像を開き、以下の条件を満たす樹状突起を選ぶ。

1. Multi-Line を用いて細胞体から 10  $\mu\text{m}$  以上離れた部位から長さ 40  $\mu\text{m}$  以上の範囲を計測できる。
2. 途中で大きな分枝がない。
3. 他の樹状突起と交わらない。

選択した樹状突起を Trace region で囲み Region > Save Region で任意の場所に任意の名前で保存する (例: region-a)。Edit > Duplicate > Image を選択すると region で指定された樹状突起画像ができる。Multi-Line で樹状突起線を引き、2 回コピー&ペーストをし、最初の Multi-Line から等間隔にずらし、樹状突起内に 3 本の線が引かれている状態にする。これを再び、Region > Save Region で任意の場所に保存する (例:

region-b)。ドレブリン染色画像を開き、Region > Load Region から保存した region-a を指定する。Edit > Duplicate > Image を選択すると、region で指定された樹状突起が表示される。Region > Load Region から保存した region-b を指定すると、先ほど引いた 3 本線がドレブリン染色画像の樹状突起内に表示される。Measure > Region Measurements を選択すると、3 本線の長さおよび輝度が表示される。Region Measurements > Open Log を選択し、Dynamic Data Exchange にチェックを入れる。Export Log Data > Sheet Name に任意の名前にし (dendrite)、OK を選択する。Excel が起動し、Region Measurements 内の Open Log が F9: Log Data になっているので、選択すると Excel 内に情報がエクスポートされる。Excel 内で 3 本線の輝度 (Average Intensity) から、3 本の平均輝度を算出する (この数値を解析する dendrite の平均輝度とする)。この数値の 2 倍の値を算出する (この値がクラスターを算出する閾値となる)。

Measure > Threshold Image > Low に算出した上記の閾値を入れ、Inclusive を選択することで、閾値以上の輝度のエリアが選択される。Delete All Region で樹状突起上の 3 本線を削除し、Integrated Morphology Analysis の Measure を押すと、クラスターがカウントされる。Integrated Morphology Analysis > Open Log > DDE にチェックを入れ、OK を選択する。Sheet Name を任意の名前にし (例: cluster)、F9: Log Data を選択すると、データがエクスポートされる。Object # がクラスターの数である。Excel ファイルには dendrite, cluster の 2 つのシートがあるので、dendrite シートの樹状突起の長さ (Distance)、cluster シートのクラスター数 (Object #) から 100  $\mu\text{m}$  あたりのクラスター数を算出し

た。

### ELISA 法

本研究では、サンドイッチ ELISA 法を行った。プレートは ELISA 用プレート S (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo) または Nunc イムノプレート・マキシソープ (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama) を使用した。固相抗体希釈バッファは PBS (pH 7.4) または、0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)、洗浄バッファは 0.05% Tween-20 in PBS (PBS-T)、ブロッキングバッファは 5% BSA in PBS-T、抗体希釈バッファは 0.1% BSA in PBS-T を使用した。固相抗体は抗ドレブリンマウスモノクローナル抗体 (クローン M2F6、以下 M2F6) を用い、検出抗体は全ドレブリン (アイソフォーム E および A) を検出する際には抗ドレブリンラビットポリクローナル抗体 (RDE1、以下 RDE1) を用い、ドレブリン A 特異的に検出する際には抗ドレブリン A 特異的ラビットポリクローナル抗体 (DAS2, Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Fujioka、以下 DAS2) を使用した。まず、固相抗体として M2F6 を固相抗体希釈バッファにて、0.4  $\mu\text{g/ml}$  に希釈し、96 ウェルプレートに 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加して 4 度で一晩インキュベートした。インキュベーション後、洗浄バッファにてウェルを 4 回洗浄し、検量線作製のスタンダードとして精製ドレブリン E、および精製ドレブリン A を 1、10、100、200、1000  $\text{ng/ml}$  に PBS にて希釈したもの、およびドレブリン E と A の混合溶液を 100  $\mu\text{l}$  ずつウェルに添加した。また、マウス (野生型マウス、ドレブリン A 特異的ノックアウトマウス、ドレブリンノックアウトマウス) 脳組織抽出液 (1  $\text{mg/ml}$ ) 100  $\mu\text{l}$  もウェルに添

加し、室温 2 時間でインキュベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファにて 4 回洗浄し、検出抗体として 5000 倍希釈した RDE1 もしくは、0.8  $\mu\text{g/ml}$  DAS2 を 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、室温 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファにて 4 回洗浄し、二次抗体として 1,000 倍希釈した HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.) を 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加して、室温 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファにて 4 回洗浄し、基質である TMB-Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate (SurModics, Ind., MN, USA、以下 TMBS) を 100  $\mu\text{l}$  添加し、室温 10–15 分インキュベート後、反応停止液として 1 N HCl を 100  $\mu\text{l}$  添加した。反応停止後、96 ウェルプレートをプレートリーダー (iMark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories) にセットし、450 nm の吸光度を測定し、検量線を作製した。その検量線を元にマウス脳組織のドレブリン量を計算した。また、固相抗体として DAS2、検出抗体として M2F6 を用いる場合、それぞれの濃度は 0.4  $\mu\text{g/ml}$  とした。この場合二次抗体は HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.) を用いた。

### 統計処理

一元配置分散分析を行い、各実験において適切な Post-hoc 比較 (Dunnett 検定、Bonferroni 検定、Tukey-Kramer 検定) により危険率 0.05 を有意水準とした。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立大学法人群馬大学が保持する動物実験の適正な実施に関する規程、「国立大学法人群馬大学動物実験安

全管理規程」に従った。

## C. 研究結果

### 1. アミロイドβオリゴマー (ADDL) 投与によるシナプス機能変化の実験

#### 1-1) ADDL の作成

まず始めにアミロイドβオリゴマーを作成し、オリゴマー化はウェスタンブロッティングにより確認した (Figure 1)。

#### 1-2) ADDL 投与によるドレブリンクラスター数の変化

100 nM の ADDL を 21DIV の海馬初代培養細胞に投与し、6 時間後、24 時間後のドレブリンクラスター数を測定したところ、経過時間依存的にドレブリンクラスター数が減少した (Figure 2)。

#### 1-3) SAHA 処理によるヒストンアセチル化の変化

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (SAHA) を投与後 1 時間および 24 時間後で、ウェスタンブロットによりヒストンのアセチル化を検討したところ、両経過時間において、SAHA の用量依存性にアセチル化ヒストンの量が増加していた (Figure 3)。

#### 1-4) SAHA 処理によるドレブリンクラスター数の変化

21DIV の海馬初代培養細胞に SAHA を投与した 1 時間後に 100 nM の ADDL を投与後ドレブリンクラスター数を DIBES 法で測定した。その結果、SAHA は ADDL の効果を阻害することがわかった (Figure 4)

### 2. アロプログナノロン投与によるシナプス機能変化の実験

種々の濃度のアロプログナノロン

(5α-pregnan-3α-ol-20-one) を培養 21 日の神経細胞に投与し、24 時間後にドレブリンクラスター数を測定した (Figure 5)。0.1 μM では有意な変化は検出できなかったが、0.3 μM, 1 μM では有意にドレブリンクラスター数が増加した。このことから、アロプログナノロンの活性を用量依存性に検出できた可能性を示している。

### 3. ELISA によるドレブリンアイソフォームの特異的定量

種々の抗体の組み合わせによりドレブリンの検出の感度を上げる方法を試みた。

3-1) 固相抗体にドレブリンに対するマウスのモノクローナル抗体 (クローン M2F6, 0.4 μg/ml) を用い、検出抗体にドレブリンラビットポリクローナル抗体 (RDE1, 5000 倍希釈) を用いて、サンプル中のドレブリン全量を検出した (Figure 6)。この系ではドレブリン E および A の全量を検出することから、精製ドレブリン E を添加したレーン (青グラフ)、精製ドレブリン A を添加したレーン (赤グラフ) およびドレブリン E と A の混合液 (黄色グラフ) でドレブリンの濃度にしたがって吸光度が上昇した。DE + DA の測定結果から標準曲線を書いて、マウス大脳皮質サンプルのドレブリン濃度を算出した。野生型マウス (WT) およびドレブリン A 特異的ノックアウトマウス (DAKO) のサンプルでドレブリンが測定できるのに対して、ドレブリンノックアウトマウス (DXKO) のサンプルではドレブリンが測定できないことから、マウス脳組織サンプル中のドレブリン E、A の量を測定することできたと考えられる。

3-2) 固相抗体にドレブリンに対するマウ

スのモノクローナル抗体（クローン M2F6、0.4  $\mu\text{g/ml}$ ）を用い、検出抗体にドレブリン A 特異的ラビットポリクローナル抗体（DAS2、0.8  $\mu\text{g/ml}$ ）を用いて、サンプル中のドレブリン A 量を検出した（Figure 7）。この系ではドレブリン A のみを検出することから、精製ドレブリン E を添加したレーン（青グラフ）では吸光度は上昇せず、ドレブリン A を添加したレーン（赤グラフ）およびドレブリン E と A の混合液（黄色グラフ）でドレブリンの濃度にしたがって吸光度が上昇した。DA の測定結果から標準曲線を書いて、マウス大脳皮質サンプルのドレブリン濃度を算出した。野生型マウス（WT）のサンプルでドレブリン A が測定できるのに対して、ドレブリン A 特異的ノックアウトマウス（DAKO）およびドレブリンノックアウトマウス（DXKO）のサンプルではドレブリンが測定できないことから、ドレブリン A の量を測定することができたと考えられる（DXKO はドレブリン E、A とともに欠損のマウスなので今回の値は実験誤差であると考えられる）。

3-3) ドレブリン A を特異的に測定するために固相抗体に 0.4  $\mu\text{g/ml}$  DAS2 を用い、検出抗体に 0.4  $\mu\text{g/ml}$  M2F6 を用いた検出法を行った。この系においても理論的には手法 3-2 と同様にドレブリン A を特異的に検出できると考えられた（Figure 8）。しかしながら、本手法ではドレブリン A を検出することができなかった。

#### 4. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の抗ドレブリン抗体染色

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を抗ドレブリン抗体で染色した。

ラット初代培養神経細胞を *in vitro* で 3 週間

ほど維持すると、多くのドレブリンクラスターが確認される（Figure 9A）。しかしながら、hiPSC-neuron（iNeuron 及び Ripro DA）ではそのようなドレブリンクラスター密度の増加は起こらなかった（Figure 9B、C）。このことから、この時期の hiPSC-neuron は十分に成熟しているとは言えず、成熟したシナプスもまだ存在していないか、あっても少数にとどまっていると考えられる。

#### D. 考察

以上の研究結果から、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  $\text{ng/ml}$  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。

#### E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

## 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)

### 2. 学会発表

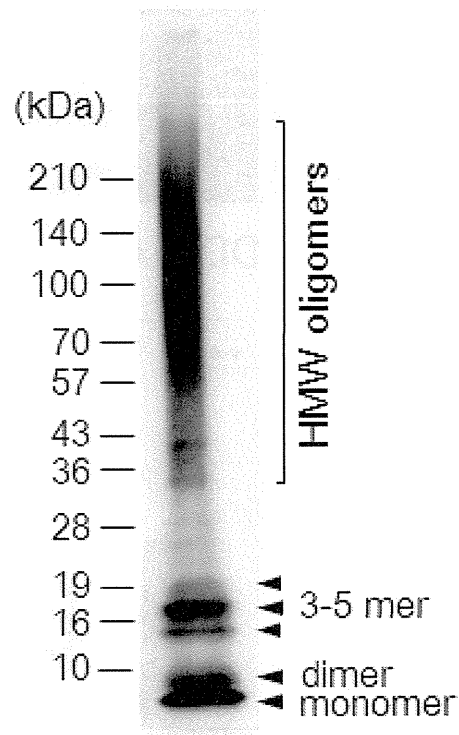
#### <国内学会>

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 iPSC 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)
- <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-HT2A 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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許出願  
 特願 2014-164695  
 発明者：白尾智明、石塚佑太、山崎博幸  
 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
2. 実用新案登録  
 なし
3. その他  
 なし

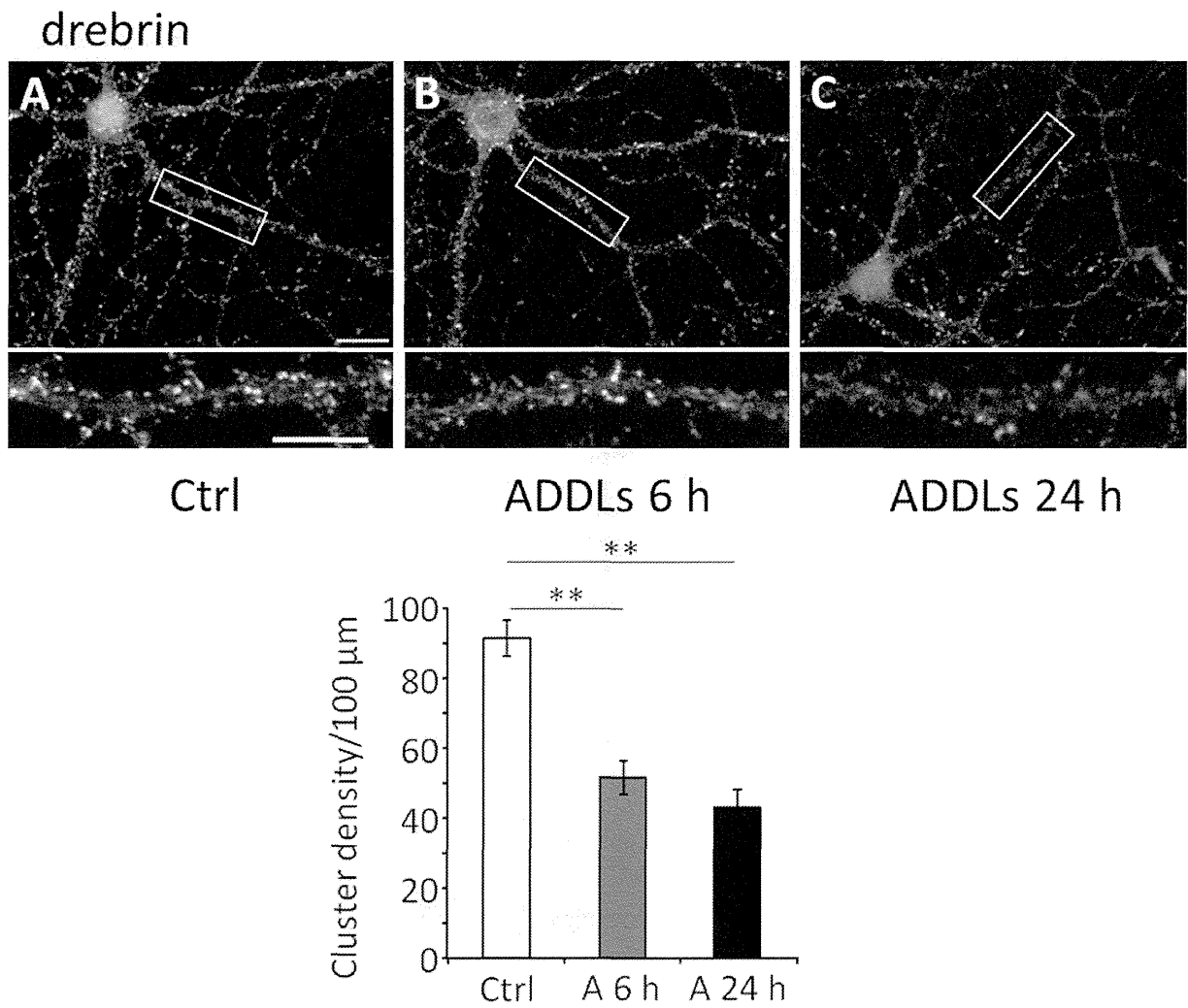
# Figure 1



**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).

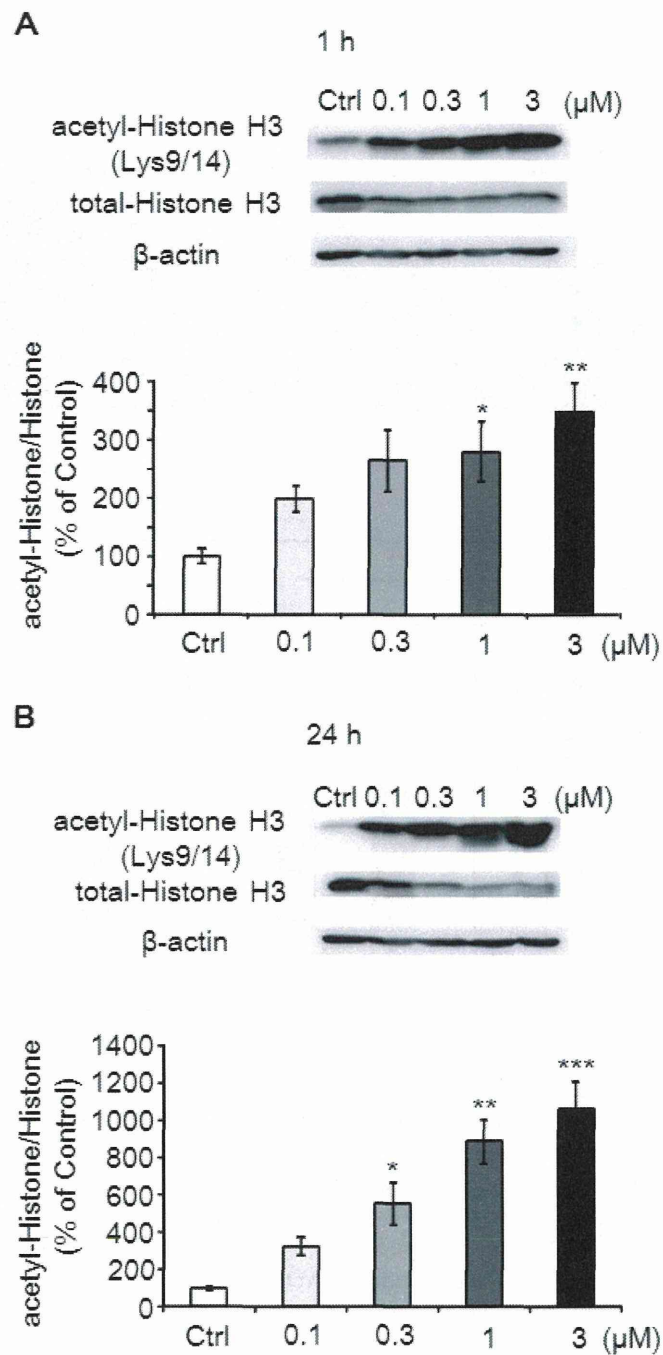


## Figure 2



**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  $\mu\text{m}$ .

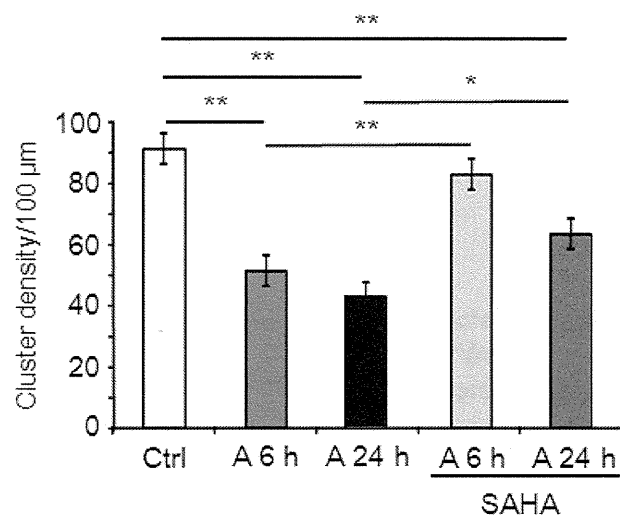
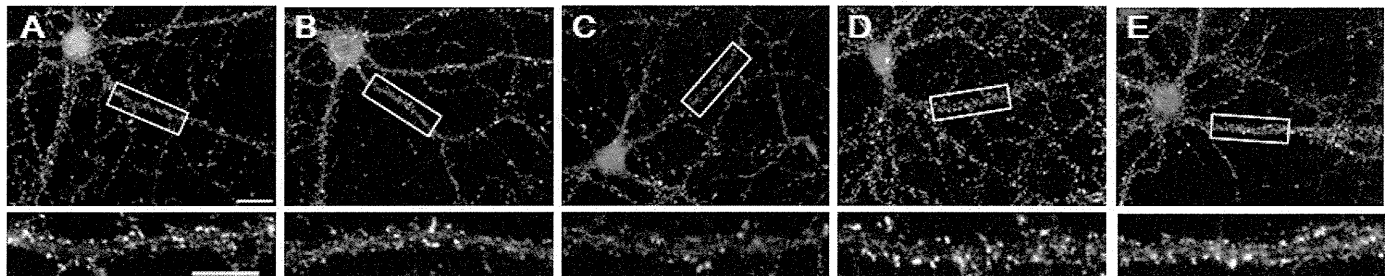
## Figure 3



**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.

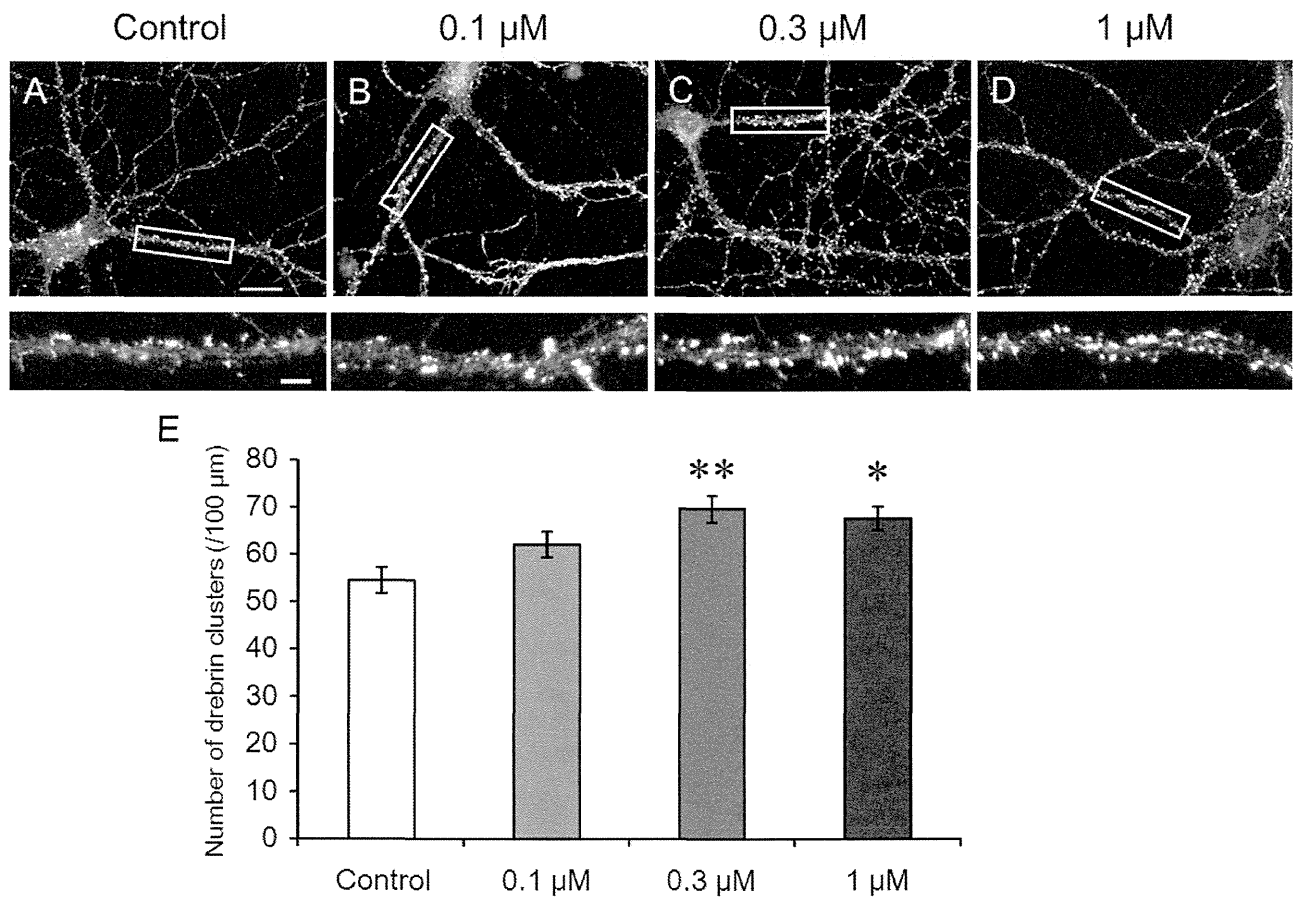
## Figure 4

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.**