

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および神経細胞を用いた in vitro 血液脳関門モデルの開発
および脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築

分担研究者 関野 祐子

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

本研究では、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築を目指している。今年度は in vitro 血液脳関門 (BBB) モデルのさらなる改良とそれに寄与するメカニズムの解明、in vitro 細胞毒性評価プロトコルのヒト iPS 細胞由来神経細胞への最適化、神経特異的細胞死 (興奮毒性) の定量評価試行、シナプス機能障害の定量評価法の確立を行った。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

佐藤 薫

最上 由香里

干川 和枝

A . 研究目的

薬物の中樞神経への作用を考えるうえでは、血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) と神経細胞、グリア細胞をユニットとしてとらえる必要があり (Fig. 1A)、脳毛細血管、ペリサイト、アストサイト、ミクログリア、神経細胞など、関連する細胞成分を包括するオールインワン型のモデルが必要である。さらに、このオールインワン型モデルをヒト細胞に置き換え、脳内移行性を考慮した in vitro 神経毒性評価系を構築することで、in vitro 実験系における薬物の有効濃度、毒性濃度のヒト予測性が向上することが期待される。本研究では、ヒト細胞として ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞由

来分化細胞の実用を試みる。本年度は、1. in vitro BBB モデルのさらなる改良、2. in vitro 神経毒性評価系について、ヒト iPS 細胞由来神経細胞毒性評価プロトコルのヒト iPS 細胞由来神経細胞への最適化、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた時の神経細胞特異的細胞毒性 = 興奮毒性の検出能力の検証、シナプス機能障害の定量評価法の確立を行う。これらを組み合わせることにより、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた脳内移行性を包括した神経毒性評価系の構築が可能となる (Fig. 1B)。

B . 研究方法

1. in vitro BBB モデルのさらなる改良

ミクログリア共存による BBB 機能向上とその裏付け

培養方法

実験にはファーマコセル株式会社のラット in vitro BBB キット (RBC-12, ファーマコセル社)を用いた。本キットは内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの3種類の細胞で構成されている。24 well plate にトランスウェルが静置されており、トランスウ

エルの内面に内皮細胞、外面（24 ウェル側）にペリサイト、プレートにアストロサイトが存在し（Fig. 1B）、培養に伴い内皮細胞が BBB 様の血管内皮細胞へと成熟する。つまりトランスウェル内が血管側、プレートの well 側が脳側となる。培養方法はファーマコセル社のプロトコルに従った。ラット初代培養ミクログリア（ 1×10^5 cells / well）は、培養 1 日目のメディウムチェンジの際、アストロサイト（脳側）に添加し、4 日間静置培養した。BBB 機能解析はすべて培養 5 日目に行った。

TEER (Transendthelial electrical resistance) の測定法

BBB キット培養後、5 日目の TEER を Endohm 抵抗値測定装置（World Precision Instruments）を用いて測定した。培養 5 日目のトランスウェルを Endohm 抵抗値測定装置に設置し、数値がほぼ安定する 10 秒後の電気抵抗値を記録した。

Sodium Fluorescein (Na-F)、Evans Blue Albumine (EBA) 透過実験

Na-F の移行量は細胞間隙輸送の指標、EBA の移行量は系細胞性輸送の指標とされている。血管側に Na-F および EBA を添加し、37 °C、30 分間インキュベートし脳側に移行した Na-F および EBA の濃度を測定した。Na-F 濃度は Em 494 nm、Ex 521nm の蛍光値を、EBA 濃度は 570 nm の吸光度に基づいて算出した。

Tight Junction proteins (TJs)、Glutamate (L-Glu) transporter の Western Blotting

透過性試験後の BBB トランスウェルの内皮細胞をサンプルバッファー中にて溶解した。作製したサンプルを SDS-PAGE で泳動分離し、PVDF メンブレンへ転写し ZO-1, Occludin, Claudin5, GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), β -actin 選択的 1 次抗体と共に一晩インキュベートした。

HRP 標識した 2 次抗体で処置した後、LAS3000（富士フィルム）を用いて化学発光シグナルを検出した。

L-glutamate (L-Glu) 濃度測定

5 日間培養した BBB キットの血管側・脳側の細胞培養液を回収し、Glutamate dehydrogenase (GDH) (20 U/ml), β nicotinamide adenine dinucleotide (β NAD) (2.5 mg/ml), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide yellow tetrazole (MTT) (0.25 mg/ml), Methylphenazinium methylsulfate (MPMS) (100 μ M) を含むアッセイバッファーと 1 対 1 で反応させ、Stop Solution で反応停止させた後、570 nm の吸光度を測定し、既知濃度の L-Glu 溶液で作成したスタンダードカーブに基づき L-Glu 濃度を求めた。

2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞による in vitro 神経毒性評価系の完成

ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルの確立

細胞毒性は Propidium iodide (PI) (死細胞にとりこまれて赤色蛍光を発する色素) / Calcein (生細胞にとりこまれて緑色蛍光を発する色素) イメージング、LDH/MTT 同時測定法 (Abe and Matsuki, Neurosci Res, 38(4) 325-9, 2000) によって得られる複数パラメーターに基づき評価した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞が初代培養齧歯類神経細胞に比較して非常にはがれやすいことから、プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性検出能力の検証

ヒト iPS 細胞 (253G1 株) 由来神経幹細胞塊を単一細胞に分散したのち 20 日間神経細胞に分化誘導した。iNeuron (CDI 社) を CDI 社プロトコルに従って解凍、

14 日間培養した。これらのヒト iPS 細胞由来神経細胞に fura2-AM をとりこませ、AQUACOSMOS システム (Hamamatsu photonics) を用いて L-Glu に対するカルシウム応答性、および L-Glu への応答に NMDA 受容体を介した成分が含まれているかどうかについて、NMDA 受容体特異的阻害剤 AP-5 と L-Glu との共添加により検討した。同じ実験バッチのヒト iPS 細胞由来神経細胞を、齧歯類初代培養神経細胞では必ず神経細胞死を引き起こす条件である 100 μ M L-Glu に 1 時間暴露し、24 時間後に細胞毒性試験 (PI/calcein imaging, LDH/MTT 同時測定) を行った。

シナプス機能障害の定量評価化法の確立

胎生 18 日齢ウイスターラットから海馬を取り出し、既報に従い初代培養を行った (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。培養 21 日目にドレブリンの免疫染色および f-actin のファロイジン染色を行った。蛍光像を CCD カメラで撮影し、定量評価法を開発した。また、グルタミン酸暴露 (100 μ M, 10 min) 後のドレブリン、アクチンのスパイン-樹状突起スパイン起始部の分布について定量評価を試みた。

C . 研究結果

1. in vitro BBB モデルのさらなる改良

ミクログリア共存による BBB 機能向上とその裏付け

in vitro BBB モデルの成熟期間中、脳側のアストロサイトにミクログリアを 1×10^5 cells / well の密度で添加したところ、TEER の優位な上昇が起こった (Fig. 2A)。NA-F や EBA の透過性には有意な変化は認められなかった。本モデルの内皮細胞の TJs (ZO-1, Occludin, Claudin5) の発現を解析した結果、ミクログリアを添加した BBB モデルでは、Claudin5 の発現が

有意に増大することが明らかになった (Fig. 2B)。

In vitro BBB モデル指定の培地には 50 μ M の L-Glu が含有されている。培養スタート時には脳側と血管側とで同じ濃度の L-Glu が 5 日間培養後には、血管側 >> 脳側の濃度勾配ができていた (Fig. 2C-c1)。上記のようにミクログリアをアストロサイトに添加し、L-Glu 濃度勾配について検討したところ、血管側の L-Glu 濃度がさらに有意に上昇した (Fig. 2C-c2)。脳側濃度は変化がなかった。ミクログリア添加によってこの L-Glu 能動的排出機能が亢進された可能性がある。脳血管内皮には L-Glu トランスポーターが発現していることが報告されている (Cohen-Kashi-Malina et al., J Cereb Blood Flow Metab 32, 177-189, 2012)。そこで、本モデルの内皮細胞についても L-Glu トランスポーターである GLAST (ヒトでは EAAT1)、GLT-1 (ヒトでは EAAT2) のコントロール群での発現、およびミクログリア添加の影響についてウェスタンブロッティングで検討した。コントロール群ですでに GLAST, GLT-1 は発現しており、ミクログリアを添加することにより、その発現量が有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 2C-c3)。

2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞による in vitro 神経毒性評価系の完成

2-1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルの確立

PI/Calcein イメージング、LDH/MTT 同時測定法によって得られる複数パラメーターに基づき、細胞毒性の評価を試みることにした。ヒト iPS 細胞由来神経細胞がこれまで in vitro 毒性評価試験に用いられてきた初代培養齧歯類神経細胞に比較して、非常にはがれやすいことから、プロトコル

を最適化した (Fig. 3A)。細胞死評価の結果については事項参照。

2-2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性検出能力検証 (Fig. 3B)

Fig. 3B にしめすように、253G1 由来神経細胞は L-Glu に対して非常に弱いカルシウム応答性を示したが、NMDA 受容体成分は検出されなかった。一方、iNeuron は総じて L-Glu に対して鋭いピークを持つカルシウム応答を示したが、NMDA 受容体成分が検出されるチューブと検出されないチューブがあった (双方ともに同ロット)。NMDA 受容体成分が検出される場合は、L-Glu 応答の約 50% が NMDA 受容体成分であった。253G1 由来神経細胞に、L-Glu を適用したところ (100 μ M, 1 hr)、PI/Calcein イメージング、LDH/MTT 測定法のいずれのパラメーターでも毒性が検出されなかった。一方、NMDA 受容体成分が検出された iNeuron は上記いずれのパラメーターでも有意な細胞毒性が検出された。

2-3. シナプス機能障害の定量評価化法

樹状突起において、スパインとその起始部の樹状突起のドレブリン分布比を Fig. 4A で示す様にスパインー樹状突起比 (spine-dendrite reition: SDR) として算出することに成功した。また、L-Glu 100 μ M を 10 分間適用すると、SDR の有意な低下が見いだされ、シナプス機能障害の SDR による定量化が可能であることが示された (Fig. 4B) (Mizui et al., PLOS ONE 9(1) e85367, 2014 より抜粋)。

D. 考察

1. in vitro BBB モデルのさらなる改良

ミクログリア共存による BBB 機能向上とその裏付け

今回、検討した TJs (ZO-1, claudin 5, occludin) は、BBB においてそれぞれ異なる

機能を持ったタンパク質である。ZO-1 は膜の裏打ちタンパク質である。Occludin は TJ の代表的な構造である TJ スランドを構成する主要なタンパク質として同定されたが、ロックアウトしても TJ 構造が破綻することはない。Occludin と同じく、TJ スランドを構成する蛋白 Claudin5 は、ロックアウトすることにより、TJ スランド構造が破綻することから、TJ 形成を運命づける最も重要な構成タンパク質であると考えられている。今回我々は、ミクログリアによって Claudin 5 の発現のみが上昇することを見いだした。ミクログリアが TJ 形成に最も重要なタンパク質選択的に発現制御をしている点は、ミクログリアによる BBB バリア機能調節の重要性を示唆している。本実験系において、内皮細胞とミクログリアは直接の接触をしていないため、ミクログリアからの液性因子がこれらの蛋白発現を制御していることが示唆される。これまでの研究から、BBB バリア機能はアストロサイト、ペリサイトから産生される Ang-1, TGF- β , VEGF, bFGF によって制御されることが示されており、特に、bFGF は Claudin5 発現を増大することが報告されている。ミクログリアから bFGF、もしくは未知の因子が産生され、BBB の Claudin5 発現を増大している可能性が示唆される。

一方、BBB に L-Glu 能動的排出機能があることも確認した。脳血管内皮細胞における L-Glu トランスポーターの発現は知られていたが、その排出能力の程度についてあまり知られていなかった。我々の結果では 5 日間の培養期間で脳側の L-Glu がほぼ 0 となり、血管側の L-Glu 濃度が上昇していた。ミクログリアを添加すると、L-Glu トランスポーターである GLAST, GLT-1 の発現が促進された。脳血管内皮細胞の L-Glu トランスポーターの発現制御

に関して報告はほとんどない。今後、ミクログリアから産生される液性因子の解明を行う。また、ミクログリア添加自体によって、脳内 L-Glu 濃度上昇が引き起こされている可能性についても確認する必要がある。

2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞による *in vitro* 神経毒性評価系の完成

2-1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した毒性評価プロトコルの確立

従来の齧歯類初代培養神経細胞に用いられてきた細胞毒性評価プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞用に最適化した。ヒト iPS 細胞由来神経細胞は齧歯類初代培養細胞に比較し、非常にはがれやすい。また、結果は示していないが、従来のプロトコルでは PI 暴露時間が 24 時間となっており、同じ条件でヒト iPS 細胞由来神経細胞を染色したところ、PI 暴露のみでほとんどの細胞が死滅してしまった。PI は DNA の二重らせん構造に intercalate することにより特有の赤色蛍光 (620 nm) が増強される。生細胞と死細胞が共存している条件では、細胞膜が侵襲をうけている死細胞のみにとりこまれ、蛍光を発するとされている。これまで、PI 自体に毒性が報告された例はなく、そのメカニズムは不明であるが、ヒト iPS 細胞の細胞毒性を評価する際には、齧歯類初代培養神経細胞で用いられている検出系の条件をマイルドにする必要があると考えた。条件検討を繰り返し、Fig. 3A で示すヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した細胞毒性プロトコルを確定した。

2-2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の興奮毒性の検出能力の検証

中枢神経系において、神経細胞どうしはシナプスという構造で接合している。シナプスは、特定条件で興奮性神経伝達物質グルタミン酸の放出確率が上昇するといった、

伝達効率の変化 = シナプス可塑性を生み出すマシナリーがあり、記憶や学習といった高次中枢神経機能の基盤となっている。その一方で、シナプス可塑性に関わる NMDA 型グルタミン酸受容体が、過剰なグルタミン酸刺激によって引き起こされる興奮毒性の原因となっている。興奮毒性は神経特異的な毒性メカニズムであり、実は非常に多くの神経障害共通のメカニズムとなっている。今回我々は、L-Glu に対するカルシウム応答に NMDA 受容体成分が含まれない 253G1 由来神経細胞標本では興奮毒性が再現できず、NMDA 成分が含まれる iNeuron では興奮毒性を再現できた。これらの結果は、医薬品等が興奮毒性を引き起こすかどうかの評価ではカルシウムイメージング等で機能的 NMDA 受容体発現が保証された標本を選別して使用する必要があることを示唆する重要なデータである。

2-3. シナプス機能障害の定量評価化法

これまで医薬品の中枢神経機能への有害影響については、ほとんど丸ごと動物を用いた *in vivo* 評価が用いられてきた。しかし、中枢神経研究の進歩により高次機能の変化と相関のある細胞レベルでの変化が数々見いだされている。その一つがシナプス機能を反映した、シナプス後部のスパイン形態の変化とスパインにクラスターするアクチン結合タンパク質ドレブリンの分布である (Takahashi et al., J Neurosci 23, 6586-6595, 2009)。我々は今回、ドレブリンのスパイン-樹状突起分布を SDR という指標を設定することにより定量化することに成功した (Mizui et al., PLOS ONE 9(1) e85367, 2014)。また、この SDR がシナプス機能に影響を与える条件の L-Glu 刺激によって低下することも確認した。これらの結果は高次機能への有害影響を、SDR を用いて予測できる可能性を示し

ている。今後はすでに中枢影響が明らかな種々の実験条件や医薬品等を用いて、SDRの高次機能への影響予測性についてデータを集積する必要がある。また、ヒト iPS 細胞由来神経細胞における SDR 算出にも取り組む。

E. 結論

・従来の in vitro BBB モデルにミクログリアを添加することにより、より強固なバリア機能を実現した。その根拠となるメカニズムの一部を明らかとした。

・PI/calcein イメージング、LDH/MTT 同時測定法の細胞毒性評価プロトコルをヒト iPS 細胞由来神経細胞に最適化した。

・NMDA 受容体を発現していなければ興奮毒性評価は困難であり、そのためのヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の選別が重要である。

・シナプス機能障害定量評価法として、アクチン結合タンパク質 drebrin の局在変化を指標とできることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizui T., Sekino Y., Yamazaki Y., Ishizuka H., Takahashi H., Kojima N., Kojima M., Shirao T. Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines” PLOS ONE 9(1) e85367 (2014)
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0085367>
2. Shigemoto-Mogami Y., Hoshikawa K., Goldman J.E., Sekino Y., Sato K. (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. J Neurosci 34(5), 2231-2243
3. Yamazaki H., Kojima N., Kato K., Hirose H., Iwasaki T., Mizui T., Takahashi H., Hanamura K., Roppongi R.T., Koibuchi N., Sekino Y., Mori N., Shirao T. (2014) Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. J Neurochem 128(4) 507-22
4. Irie T., Matsuzaki Y., Sekino Y., Hirai H. (2014) Kv3.3 channels harboring a mutation of

spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. J Physiol., 592(Pt1) 229-47

5. Ishikawa M., Shiota J., Ishibashi Y., Hakamata T., Shoji S., Fukuchi M., Tsuda M., Shirao T., Sekino Y., Ohtsuka T., Baraban J.M., Tabuchi A. (2013) Identification, expression and characterization of rat isoforms of the SRF coactivator MKL1. FEBS Open Bio. 3, 387-93
6. Takahashi K., Ishii-Nozawa R., Takeuchi K., Nakazawa K., Sekino Y., Sato K. (2013) Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner. Biol Pharm Bull 36(12), 1996-2004
7. Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T., Sato K. (2013) Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. J Toxicol Sci 38(3), 381-402
8. Yamada S., Kotake Y., Sekino Y., Kanda Y. (2013) AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. Metallomics 5:484-91

2. 学会発表

< 国内学会 >

1. 佐藤 薫、関野祐子、化学物質が生後初期神経・グリア新生に及ぼす影響を簡便に検討するための in vitro 評価系の開発、日本薬学会 第 134 年会(2014. 3)(熊本)
1. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、大津香苗、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本を用いた神経毒性評価系の構築、日本薬学会 第 134 年会(2014. 3)(熊本)
2. 片山敦子、門馬彰彦、秋友孝文、虞末 愛、星 裕姫乃、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫、胎生期および新生期の化学物質暴露の情緒社会性への影響を予測する、遺伝子発現解析に基づく新規評価手法の開発、日本薬学会 第 134 年会(2014. 3)(熊本)
3. 最上(重本)由香里、干川 和枝、関野 祐子、佐藤 薫、ミクログリアによる血液脳関門の機能制御機構の解明、日本薬学会 第 134 年会(2014. 3)(熊本)
4. 笠原由香、三浦真理恵、最上(重本)由香里、関野祐子、佐藤 薫、鈴木岳之、抗うつ薬と P2X4 受容体の相互作用の比較検討、日本薬学会 第 134 年会(2014. 3)(熊本)
5. 佐藤 薫、ミクログリアの病理的新機能と生理的新機能 極性からみた神経疾患治療の可能性、第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム「ニューロン・グリア連関から紐解く神経疾患」(2014. 3)(仙台)
6. 佐藤 薫、hiPSC-ニューロンで神経特異的有害反応は予測可能か、公開シンポジウム ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～(2014. 2)(東京)
7. Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Ohtsu K, Okada, Okano H, Sekino Y, Sato K, An attempt to establish the neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 7th Takeda science foundation symposium on pharmasciences iPS Cells in drug

- discovery and development' (2013. 1)(大阪)
8. 佐藤 薫、高橋 華奈子、重本 最上 由香里、大津香苗、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた神経毒性評価系確立の試み、第 22 回日本バイオイメージング学会(2013. 9)(東京)
 9. Sato K, Fujimori K, Takaki J, Suzuki T, Sekino Y, P2X4 receptor-mediated acceleration of microglial activation is important for the L-glutamate release from activated microglia in the early stage of inflammation, Neuro2013 (2013. 6)(京都)
 10. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Miura M, Sekino Y, Sato K, Development of in vitro blood-brain barrier model reflecting the function of neurovascular unit, Neuro2013 (2013. 6)(京都)
 11. Takahashi K, Irie T, Sekino Y, Sato K, The function of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 is enhanced by docosahexanoic acid, Neuro2013(2013. 6)(京都)
 12. Ohtsu K, Takahashi K, Shigemoto-Mogami Y, Okada Y, Okano H, Sato K, Sekino Y, An Attempt to develop a neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons vulnerable to excitotoxicity, Neuro2013 (2013. 6)(京都)
 13. Hoshikawa K, Shigemoto-Mogami Y, Ohno Y, Goldman JE, Sekino Y, Sato K, Activated microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis via inflammatory cytokines, Neuro2013 (2013. 6)(京都)
 14. Katayama A, Monma A, Akitomo K, Hirosue M, Hoshi Y, Moriguchi T, Sekino Y, Sato K, Search for genetic markers for the risk of the postnatal exposure to chemical compounds in emotion and social behavior after maturation, Neuro2013(2013. 6)(京都)
 15. 関野祐子、大原由香、佐藤 薫、高橋華奈子、山崎博幸、白尾智明、iPS 細胞由来分化細胞の生理機能を確認するための実験プロトコル作成の試み、第 6 回上肢の神経機能回復セミナー(2013. 6)(秋田)
- microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013. 4) (Merida, Mexico)
5. Sekino Y, Takahashi K, Mogami-Shigemoto Y, Ohtsu K, Okada Y, Okano E, Sato K, Calcium signalling of human iPS-derived neurons responding to ATP and L-glutamate stimulation. ISN-ASN 2013 (2013. 4) (Cancun, Mexico)
 6. Sekino Y, Takahashi K, Mogami-Shigemoto Y, Ohtsu K, Okada Y, Okano H, Sato K, Calcium imaging of responses to ATP and L-glutamate stimulation of human iPS-derived neurons. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013. 4) (Playa del Carmen, Mexico)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

< 国際学会 >

1. Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Goldman JE, Sekino Y, The role of microglia in neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. SfN2013 (2013. 11) (San Diego, USA)
2. Ohara Y, Yamazaki H, Sato K, Shirao T, Sekino Y, Morphological development and expression of synaptic proteins of human iPSC-derived neurons. SfN2013 (2013. 11) (San Diego, USA)
3. Sato K., Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 (2013. 4) (Cancun, Mexico)
4. Sato K, Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, L-Glutamate released from activated