

- drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study. (2014) *J Pharmacol Sci.* 124(4): 494-501
10. 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. (2014) *Neuroreport.* 25(8): 585-592
 11. Yamazaki H, Kojima N, Kato K, Hirose H, Iwasaki T, Mizui T, Takahashi H, Hanamura K, Roppongi RT, Koibuchi N, Sekino Y, Mori N, Shirao T, Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. (2014) *J Neurochem.* 128(4): 507-522
 12. 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. (2014) *PLOS ONE.* 9(1) e8536722
 13. Irie T, Matsuzaki Y, Sekino Y, Hirai H, Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. (2014) *J Physiol.* 592(Pt1) 34: 229-247
 14. 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)
 15. 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
 16. 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
 17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. Takaki, J., Fujimori, K., Miura M., Suzuki T., Sekino, Y., Sato, K., L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the ‘collusion’ hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. (2012) *J. Neuroinflammation* 9
- Sato, K., Kuriwaki J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T. (2012) Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci* 3 (2), 105-113

2. 学会発表

【国内学会】

1. 関野 祐子、ヒト iPS 細胞由来組織細胞を用いた化学物質の安全性評価法の開発、日本化学会秋季事業第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014 (2014.10) (東京)
2. 関野 祐子、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた新規安全性薬理試験法の開発と評価、第 58 回日本薬学会関東支部大会 ランチョンセミナー (2014.10) (東京)
3. 関野 祐子、ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた安全性薬理学の新たな展望、第 21 回 HAB 研究機構学術年会

- (2014.5) (東京)
4. 関野 祐子、h-iPS 由来神経細胞を利用した薬理試験法開発の現状と課題、第 7 回上肢の神経機能回復セミナー (2014.5) (秋田)
 5. 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 iPS 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)
 6. 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)
 7. 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 iPS 細胞由来神経細胞の探索、日本薬学会 第 135 年会 (2015.3) (神戸)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
12. 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)
 13. 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)
 14. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sekino Y, Sato K, Development of in vitro blood-brain barrier model including microglia, Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
 15. 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)
 16. Roppongi RT, Ohara Y, Koganezawa N, Yamazaki H, Ohtsu M, Sato K, Sekino Y, Shirao T, Slow axonal growth in human iPSCs-derived neurons, Neuroscience2014 (2014.9) (Yokohama)
 17. 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学会・第 57 回 日本神経化学学会大会合同大会 (2014.9) (奈良)
 18. Ohtsu 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学会・第 57 回 日本神経化学学会大会合同大会 (2014.9, 奈良)
 19. 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)
 20. 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)
21. 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)
22. 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)
23. 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)
24. 佐藤 薫、ミクログリアの病理的新機能と生理的新機能一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)
25. 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)
26. 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)
27. 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jing学会 (2013. 9) (東京)
28. 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)
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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)
33. Katayama A, Monma A, Akitomo K, Hirose 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)
34. 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ール作成の試み、第 6 回上肢の神経機能回復セミナー (2013. 6) (秋田)
35. 佐藤 薫、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価系の可能性、日本薬学会第 133 回年会シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築 ―現状と課題そして期待―」(オーガナイザー、シンポジスト)、日本薬学会第 133 回年会 (2013.3) (横浜)
36. 最上 (重本) 由香里、干川 和枝、三浦 麻利衣、関野 祐子、佐藤 薫、神経細胞とグリア細胞 (アストロサイト・ミクログリア) が共存する新規 In Vitro 血液脳関門モデルの開発、日本薬学会第 133 回年会 (2013.3) (横浜)
37. 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の遺伝子発現プロファイリングの株間比較、日本薬学会第 133 回年会 (2013.3) (横浜)

38. 片山 敦子、門馬 彰彦、秋友 孝文、廣末 愛、星 裕姫乃、守口 徹、関野 祐子、佐藤 薫、バルプロ酸幼弱期暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー遺伝子群の探索、日本薬学会第 133 回年会 (2013.3) (横浜)
39. 佐藤 薫、片山 敦子、門馬 彰彦、守口 徹、関野 祐子、バルプロ酸を胎生期あるいは生後適用したラット扁桃体の遺伝子発現マイクロアレイ解析、第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3) (福岡)
40. 最上 由香里、大野 泰雄、ジェームズ E ゴールドマン、関野 祐子、佐藤 薫、ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を促進する、第 86 回 日本薬理学会年会 (2013.3) (福岡)
41. 佐藤 薫、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた毒性評価実現にむけた取り組み、スーパー特区フォーラム in 大阪 (講演) (2013, 1) (大阪)
42. 三浦 麻利衣、佐藤 薫、鈴木 岳之、グリア型グルタミン酸トランスporter機能に対し極長鎖脂肪酸が与える影響の検討、第 6 回先端分子薬理研究会 (2012. 12) (東京)
43. 大和田 智彦、佐藤 薫、栗脇 淳一、高橋 華奈子、斉藤 善彦、岡 淳一郎、中澤 憲一、関野 祐子、沙 宇、尾谷 優子、タモキシフェンを基盤としたグルタミン酸トランスporter阻害剤の開発、第 30 回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2012. 11) (東京)
44. Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Igarashi, Y., Hirose, A., Sekino Y., Sato, K., Effects of carbon nanotubes on proliferation of neural stem cells and microglial viability, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9) (名古屋市)
45. Takahashi, K., Tomohiko I., Sekino, Y., Sato, K., Development of the epitope-tagged EAAT2 in *Xenopus* oocyte expression system, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9) (名古屋市)
46. Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Otomo, Y., Imai, M., Akitomo, T., Takahashi, Y., Kato, F., Sekino, Y., Sato, K., Search for genetic markers for risks in emotion and social interaction caused by exposure to chemical compounds in embryonic or neonatal periods, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9) (名古屋市)
47. Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y., The Clonal difference in response

- to L-glutamate and ATP of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, 第 35 回 日本神経科学大会 (2012. 9) (名古屋市)
48. 最上 (重本) 由香里、関野 祐子、佐藤 薫、生後ラットの脳・SVZ 周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している、第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
49. 片山 敦子、守口 徹、関野 祐子、佐藤 薫、幼弱期化学物質暴露による情緒社会性への影響の予測、第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9) (甲府市)
50. 高橋 華奈子、入江 智彦、関野 祐子、佐藤 薫、グルタミン酸トランスポーター EAAT2 機能調節機構の解析ツールとしてのエピトープ標識 EAAT2 の開発、第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
51. 佐藤 薫、栗脇 淳一、高橋 華奈子、齊藤 善彦、岡 淳一郎、尾谷 祐子、謝 宇、中澤 憲一、関野 祐子、大和田 智彦、タモキシフェンを基盤とした新規グルタミン酸トランスポーター阻害剤の開発、第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9) (甲府市)
- 【国際学会】
1. Sekino Y, JiCSA Study Data Review (JiCSA 研究データのまとめ) CIPA Update Workshop CSRC-HESI-SPS-FDA Meeting (2014.12) (Maryland, USA)
 2. Sekino Y. Human iPS-derived cardiomyocyte for development of in vitro pre-clinical testing (ヒト iPS 由来心筋細胞を用いたインビトロ前臨床試験の開発) ILSI HESI, Stem cell-derived Cardiomyocytes as Model of Cardiac Pathology and Toxicity Workshop (2013.3) (Cambridge, USA)
 3. Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sekino Y, Microglia accelerate the maturation of barrier function of blood brain barrier, SfN2014 (2014.11) (Washington D.C., USA)
 4. Koganezawa K, Ohara Y, Yamazaki H, Roppongi RI, Sato K, Sekino Y, Shirao T, Axonal polarity formation in human iPSCs-derived neurons, SfN2014 (2014.11) (Washington D.C., USA)
 5. 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)
6. Sekino Y, Ootsu M, Ohara Y, Yamazaki H, Sato K, Roppongi R, Koganezawa N, Shirao T, Effects of valproic acid and astemizole on the neurite growth of human iPSCs-derived neurons, SPS 14th annual meeting (2014.10) (Washington D.C., USA)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013. 4) (Merida, Mexico)
 12. 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)
 13. 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

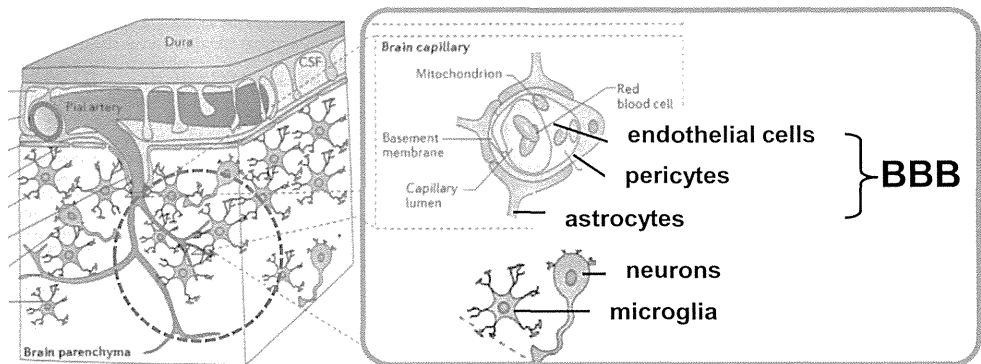
- of human iPS-derived neurons.
ISN-ASN 2013 satellite meeting
(2013. 4) (Playa del Carmen,
Mexico)
- 14.Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J.,
Suzuki, T., Sekino, Y., Paroxetine
Prevents the Functional
Impairment of L-Glutamate
Transporters in Inflammation by
Modulating Microglial Glutamate
Release. SfN 2012 (2012. 10)
(New Orleans, USA)
- 15.Sato, K., Takahashi, K.,
Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K.,
Okada, Y., Okano, Y., Sekino, Y.,
The comparative study of the
mRNA-expression of P2 receptors
and glutamate receptors between
neurons differentiated from
201B7 and 253G1 human induced
pluripotent stem cell lines. the
11th biennial meeting of APSN
and the 55th annual meeting of
JSN (2012. 9) (Kobe, Japan)
- 16.Sekino, Y., Takahashi, K.,
Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K.,
Okada, Y., Okano, Y., Sato, K.,
The clonal difference in response
to ATP and L-Glutamate of
human induced pluripotent stem
cell-derived neurons, the 11th
biennial meeting of APSN and the
55th annual meeting of JSN (2012.
9) (Kobe, Japan)
- 17.Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi,
K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y.,
Sha, Y., Nakazawa K., Sekino, Y.,
Ohwada, T. Discovery of a
tamoxifen-related compound that
suppresses glial L-glutamate
transport activity without
interaction with estrogen
receptors, FENS meeting 2012
(2012.7) (Barcelona, Spain)
- 18.Sato, K., Takahashi, K.,
Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K.,
Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.
The clonal difference in response
to ATP of human induced
pluripotent stem cell-derived
neurons, ISSCR2012 (2012.6),
(Yokohama, Japan)
- 19.Sato, K., Takahashi, K.,
Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K.,
Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y.
The clonal difference in response
to ATP of human induced
pluripotent stem cell-derived
neurons, Purine2012 (2012.5-6),
(Fukuoka, Japan).

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

Figure 1

A
Neurovascular unit comprised of BBB, microglia, and neurons



Modified images from Zlokovic, Nature Reviews 2011, 12, 723-38

B

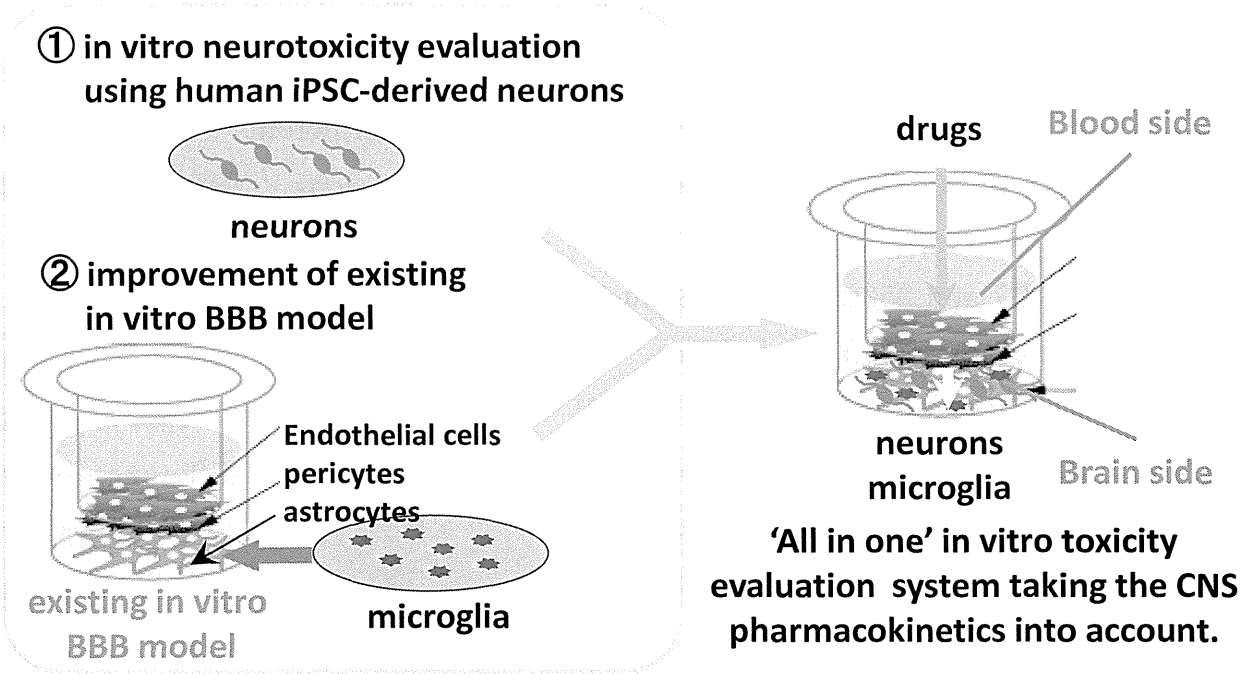


Fig. 1 The concept of our project
A. Neurovascular unit (NVU) is comprised of BBB, microglia, and neurons. Because drugs in the CNS reach neurons via BBB, the model system reproducing NVU is necessary to predict adverse effects on the CNS functions. B. We will establish the 'all in one' in vitro toxicity evaluation system taking the CNS pharmacokinetics into account.

Figure 2

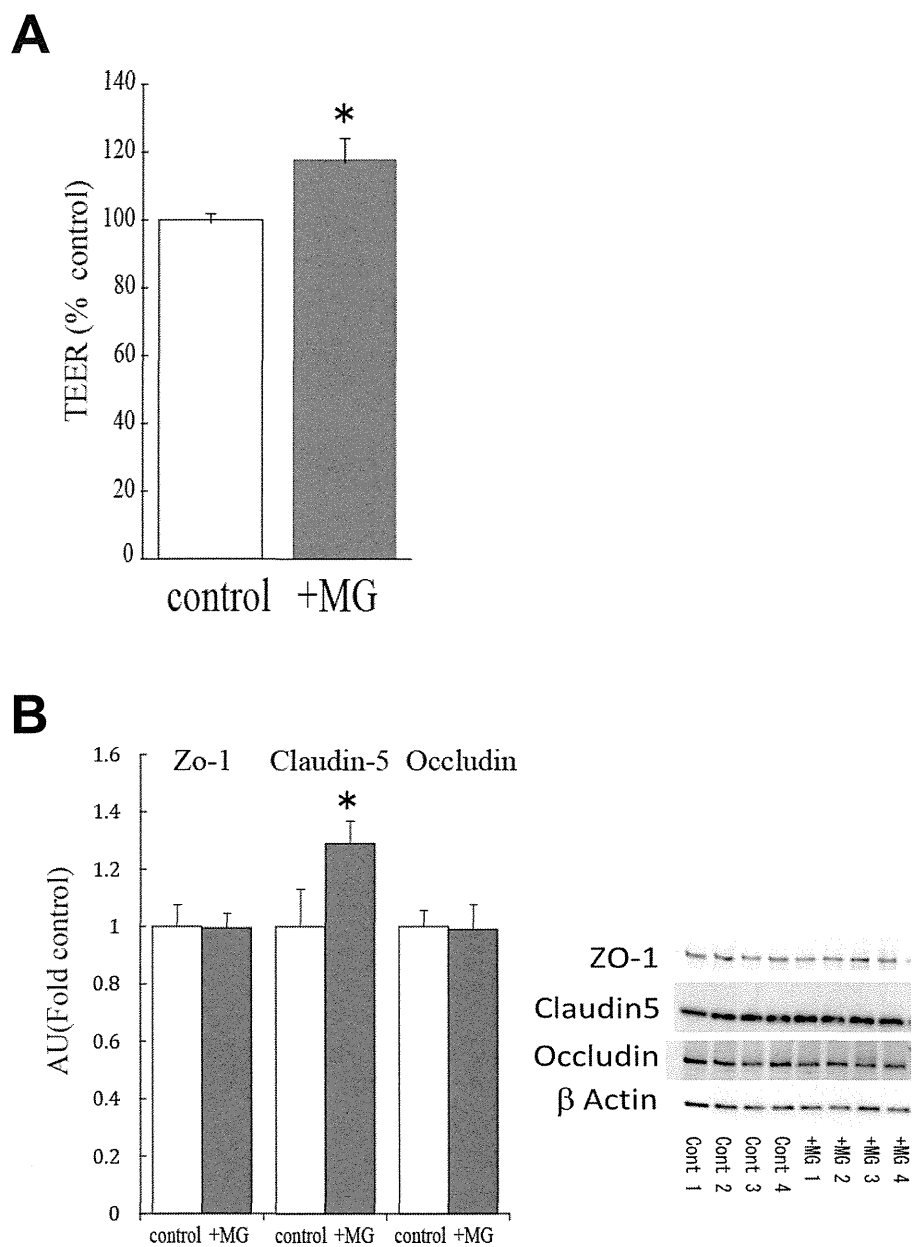


Fig. 2 Effects of microglia on the barrier function of BBB

A. 4-day co-existence of microglia with astrocytes significantly increased TEER of in vitro BBB model.

B. Microglia also increased the expression level of Claudin5 which is important for the barrier functions of BBB

**: 0.01, *: $p < 0.05$, Student's t test. Error bars represent s.e.m.

Figure 3

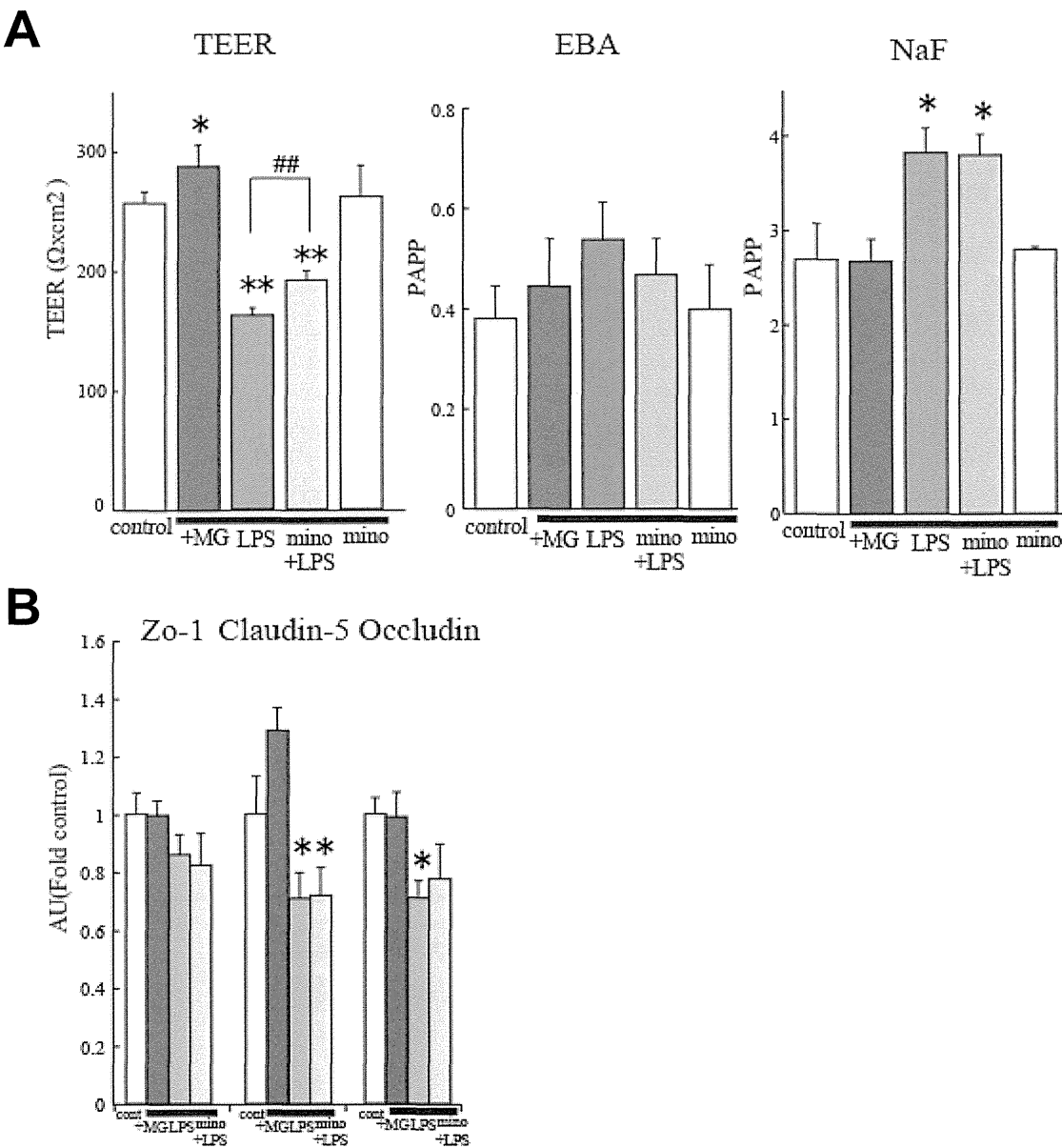


Fig. 3 Effects of LPS-activated microglia on the barrier function of BBB.

- A. 4 day co-existence of LPS-activated microglia with astrocytes significantly decreased TEER, increased permeability of NaF of in vitro BBB model, whereas permeability of EBA remain unchanged.
- B. LPS-activated microglia also decreased the expression level of Claudin5 and Occludin, which are important for the barrier function of BBB.

**: <0.01; *: <0.05 vs. control, ##: <0.01; #: <0.05 vs. +MG, by Tukey's test following ANOVA. Error bars represent s.e.m.

Figure 4

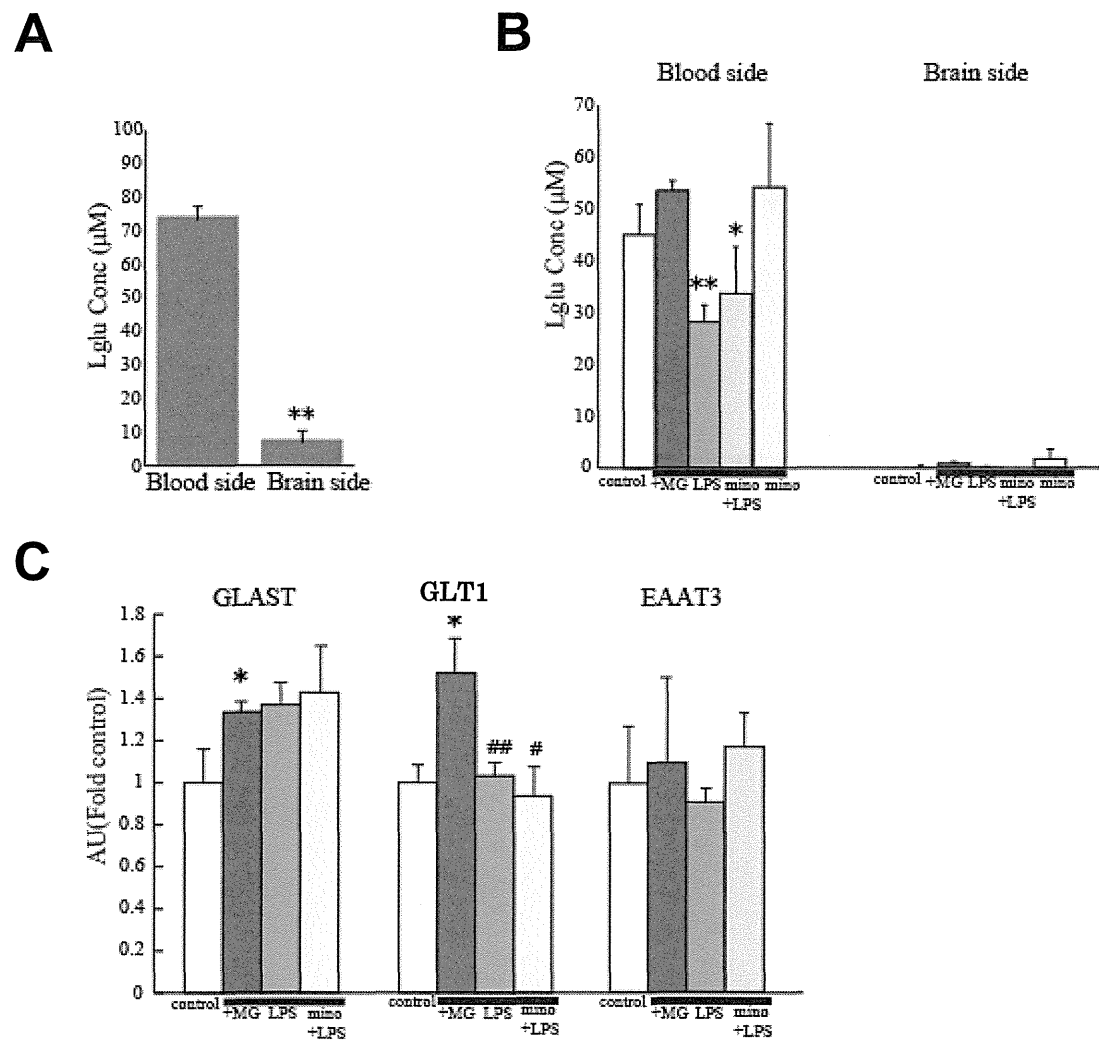


Fig. 4 Effects of LPS-activated microglia on the L-Glu transport activity of BBB.
A. After 5 day-incubation, L-Glu (50 μM at the start point) in the brain side was transported to the blood side.
B. In the presence of the activated-microglia, the increase in L-Glu in brain side was significantly suppressed.
C. Activated-microglia decreased the expression levels of GLT-1, but not GLAST and EAAT3.
**: <0.01; *: <0.05 vs. control, ##: <0.01; #: <0.05 vs. +MG, by Tukey's test following ANOVA. Error bars represent s.e.m.

Figure 5

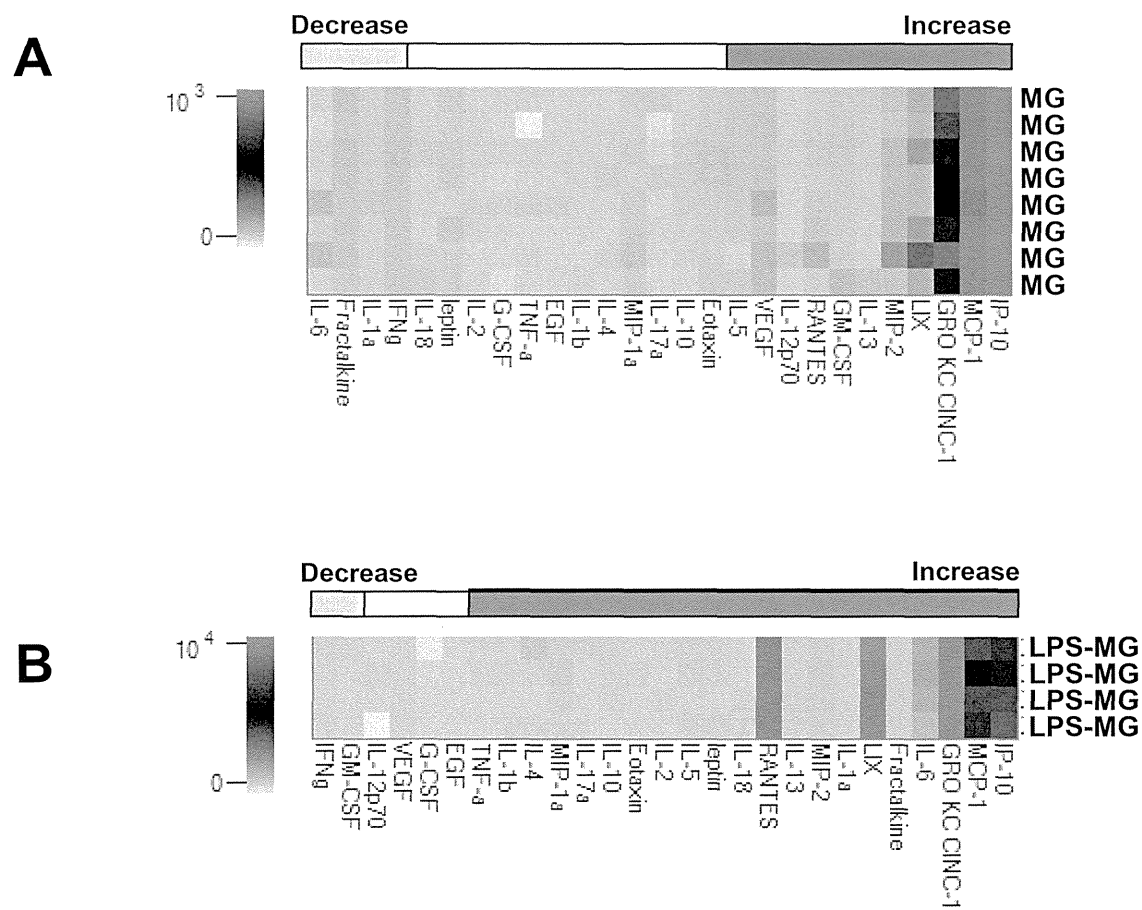


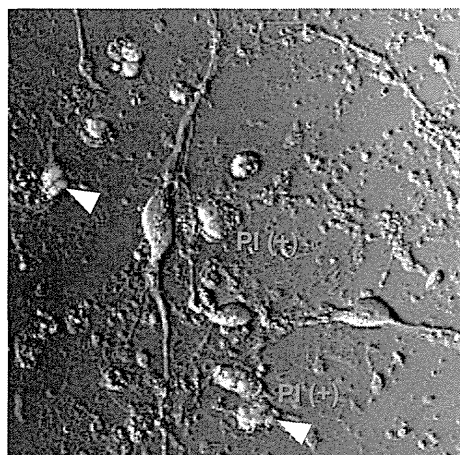
Fig. 5 The comprehensive quantitative analysis of cytokines and chemokines concentrations in the BBB culture supernatant.

- A. 4 day co-existence of microglia with astrocytes significantly increased 11 chemokines and cytokines (VEGF, MCP-1, IP-10 etc.) and significantly decreased Fractalkine (vs. median of control group).
- B. LPS-activated microglia significantly increased 18 chemokines and cytokines (RANTES, LIX, IL-6, GRO KC CINC-1, MCP-1, IP-10 etc.,).

The data shows as heatmap-graph analyzed by Milliplex analysis software.

Figure 6

A



B

細胞生存・細胞死判定

PI / Calcein 染色 死細胞は赤色、生細胞は緑になる。

試薬・器具

- 3 mM (2 mg/ml) PI (Propidium iodide); dojindo P346 / Millipore
- 最終使用濃度 (×2000): 1.5 μM
- 実験使用濃度 (×1000): 3 μM (訂正済み) 培地で調整
- 3 mM (1 mg/ml) Calcein-AM; dojindo C396
- 最終使用濃度 (×2000): 0.5 μM
- 実験使用濃度 (×1000): 1 μM (訂正済み) 培地で調整

8 well テンプレート (Lab-Tek® 8 well-plates) を使う

- 各ウェルから培地を約1/2量吸引除去後、試験薬物 (濃度は最終使用濃度の 2 倍) 入り培地を培地量の 1/2 量加える
- CO₂ インキュベーターで、24-48 hrs インキュベート (37°C)
- 各ウェルから培地を約1/2量吸引除去後、3 μM PI 入り培地を培地量の 1/2 量加え 4 時間インキュベート後、各ウェルから培地を約1/2 量吸引除去後 1 μM calcein-AM 入り培地を培地量の 1/2 量加え 15 分インキュベート
- 蛍光顕微鏡

・現在、顕微鏡では BioReader で撮影、オートセルカウントでカウントしているから、もう一度目視で確認が必要でないか確認している。

LDH assay, MTT assay

96 well plastic プレートを使う

- 各ウェルから培地を 1000P を用いて吸引除去後、試験薬物入り培地 80 μl を加える
- CO₂ インキュベーターで、24-48 hrs インキュベート (37°C)
- LDH assay の 1 hr 前に、Total LDH 測定用培地 (10% Triton-X 100 / PBS 0.8 μl を添加する (最終濃度 0.1%))
- 50 μl 培地を回収し新しい 96 well プレートへ ⇒ LDH assay
- 30 μl 培地を回収したプレート ⇒ MTT assay

・改訂

LDH assay

× 細胞が非常に多いので培地の交換を必要とする単位は半量交換を基本とする。

× ヒト iPS 細胞由来神経細胞は、rodent cell よりも細胞死が顕著な可能性がある。PI 染色のプロトコルは一般的には 24 時間暴露であるがこの条件下で死滅する細胞も存在した (改訂済み)。従って、染色可能な最短時間ということで 4 時間を設定した。calcein-AM の浸透性が非常に低下しやすくなり、2 時間おくと染色能がかなり低下することを確認した。

calcein-AM 入り培地は処理の直前に調整し、観察直前に長時間染色するとよい。

LDH assay

× 96 well プレートを使う理由

N 数をあげるための Well 内細胞密度にムラが大きいので底面が狭い方がよい。比較的長期間、均一に接着する。

・培地量を 80 μl にした理由

培地、LDH、MTT 濃度を濃い状態で定量化したい。

× マルチチャンネルピペットは使わない。少ない培地量を正確に回収する、細胞の剥離をふせぐため、ピペットマンを使う。

× 同じ実験セッションでは Wash-out の回数も数回にそろえないと落着く細胞に差が出る。ある (LDH のコントロールや Triton-X 100 処理時) で特に注意する。

・MTT assay の方が LDH assay よりも感度が高い。

MTT assay はミトコンドリア活性をばかっている。

LDH assay では assay 開始時の細胞死の影響を受けやすい。

試薬・器具

- 96 well プレート
- マイクロプレートリーダー

測定波長 570 nm, 参照波長 655 nm

試薬・器具

- 10% Triton-X 100 / PBS
- 最終使用濃度 (×100): 0.1 %
- Assay buffer

Tris-HCl (pH 8.2)

Lactate lithium salt; sigma L2250

beta-NAD (beta-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate); sigma N6522

Triton-X 100

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide); sigma M2128

MPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate); sigma M8640

Assay buffer 作成用 stock 溶液:

200 mM Tris-HCl (0.1 % Triton-X 100 入り, pH 8.2) / Millipore

2.5 mg/ml MTT / PBS

100 mM MPMS / PBS

MTT assay

試薬・器具

- 96 well プレート
- マイクロプレートリーダー

測定波長 570 nm, 参照波長 655 nm

試薬・器具

- 5 mg/ml MTT / PBS
- 最終使用濃度 (×10): 0.5 mg/ml 培地で調整
- ホルマザン溶解液
- 4 mol/l 塩酸 0.1 ml にイソプロピルアルコールを加えて、10 ml に希釈する

培地が 30 μl 残った 96 well プレートの細胞

- 各ウェルに 0.5 mg/ml MTT 入り培地 30 μl を加える (total 培地量 60 μl)
- CO₂ インキュベーターで、4 hrs インキュベート (37°C)
- 各ウェルから MTT 入り培地を 1000P を用いて吸引除去後、ホルマザン溶解液 50 μl を加える
- 5 mins インキュベート (室温)
- マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定 (Blank; ホルマザン溶解液)

Stop buffer (pH 7.4)

20% (v/v) SDS (sodium dodecyl sulfate); sigma L4390

50% (v/v) DMF (N,N-dimethylformamide); wako 045-02916

回収した培地入り 96 well プレート

- 各ウェルに Assay buffer を 50 μl ずつ加える
- インキュベーター (室温, 7 min)
- 各ウェルに Stop buffer を 100 μl ずつ加える
- マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定 (Blank; 培地及び試験薬物入り培地)

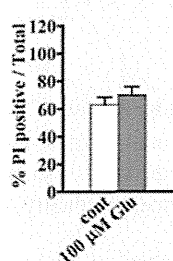
PI staining, LDH assay, MTT assay で毒性を検出している薬物

薬物	カタログ番号	stock
staurosporin	Wako 197-10251	1 mM / DMSO
rotenone	sigma R8875	1.25 mM / DMSO

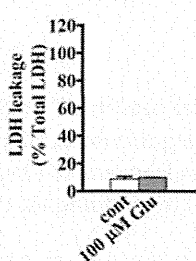
・培地を抜いた方が感度が上がる。培地内 phenol red の影響のため。従って、試験薬物を入れる段階で phenol red (-) 培地に切り替える方法もある。

C

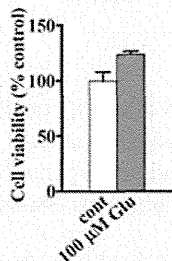
253G1
PI / Calcein



LDH

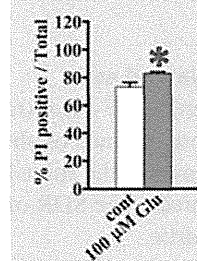


MTT

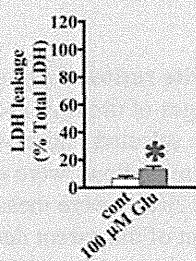


iNeuron

PI / Calcein



LDH



MTT

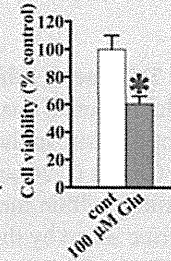
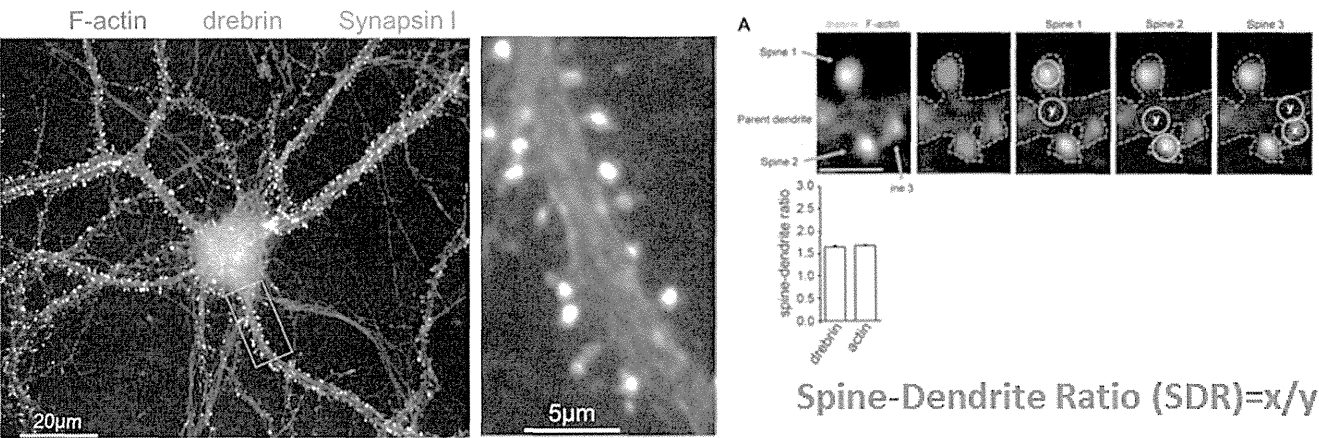


Fig. 6 In vitro toxicity evaluation using human iPS cell-derived neurons.

- Establishment of evaluation method for neuronal death. human iPS-derived neurons (253G1) were double-stained with Hoechst 33342 and PI. This method allowed to discriminate dead cells from viable cells. Apoptotic cells could be also determined by DNA fragmentation and apoptotic bodies revealed by PI staining (arrowheads).
- Standard protocol for the in vitro neurotoxicity (MTT, LDH, and PI/calcein assay).
- Effects of L-Glu (100 μM, 1 hr) on the viability of hiPSC-derived neurons with (iNeuron) or without (253G1). Excitotoxicity was detected only in iNeurons. 253G1 Establishment of the evaluation methods for impaired synaptic function. *: <0.05 vs. cont, student's t test (N=6).

Figure 7

A



B

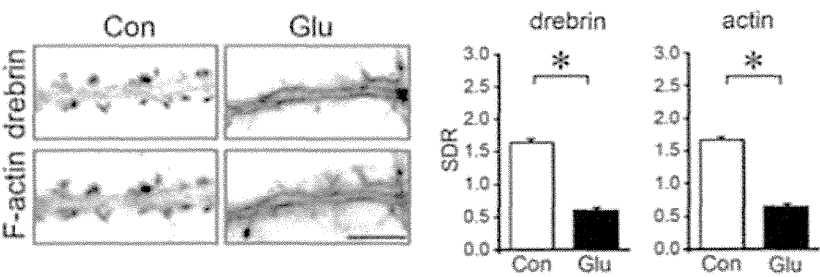


Fig. 7 Spine-dendrite ratios of drebrin and actin

A. Fluorescence images of drebrin (green) and F-actin (red) in control hippocampal neurons. The dendritic spines and the parent dendrite in the selected region were outlined on the F-actin fluorescence images (white dotted lines). Scale bar = 2 μm. Circles (0.26 μm², yellow) were drawn at the spine head and at the parent dendrite, and the average fluorescence intensities within the circles were measured. The SDR of each spine was obtained by dividing the average intensity of the dendritic spine by that of the parent dendrite.

B. Effects of L-Glu stimulations (100 μM, 10 min) on drebrin-actin distribution. Images were obtained from neurons (21 DIV) double-labeled for drebrin and F-actin. Bar graphs represent the spine-dendrite ratios (SDRs) for drebrin and actin. After stimulation, the drebrin and F-actin clusters in the spines disappeared, and a linear staining pattern appeared along the dendrite. Both the drebrin and actin SDRs were significantly decreased by L-Glu stimulation. n = 170 cells; *: p<0.01, Student's *t* test. Error bars represent s.e.m.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tashiro K, Hirata N, Okada A, Yamaguchi T, Takayama K, Mizuguchi H, <u>Kawabata K.</u>	Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor separates hematopoietic and cardiac progenitor cells in Flk1-expressing mesoderm.	<i>Stem Cells Transl Med.</i>			in press
Okada A, Tashiro K, Yamaguchi T, <u>Kawabata K.</u>	Selective differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers.	<i>Springer Protocol Methods in Molecular Biology ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition.</i>			in press
Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, <u>Kawabata K.</u> , Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-x _L mutant gene.	<i>Cell Transplant.</i>			in press
Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, <u>Kawabata K.</u> , Mizuguchi H.	Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,</i>	47	16772-7	2014

Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K , Furue MK, Mizuguchi H.	HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin.	<i>PLoS One.</i>	3	e90791	2014
Tashiro K, Nonaka A, Hirata N, Yamaguchi T, Mizuguchi H, Kawabata K .	Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow.	<i>Stem Cells Dev.</i>	18	2202-2210	2014
Taura A, Furuta K, Yamaguchi T, Kawabata K , Tanaka S.	Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfi1 and Gfi1b, in murine cultured mast cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	1	81-86	2014
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.	<i>Neurosci Lett</i>	590C	126-31	2015
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.	<i>PLoS One.</i>	9(1)	e8536722	2014
Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y , Sato K	Microglia enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone.	<i>J Neurosci</i>	34(5),	2231-43	2014
Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y , Naito M, Kurihara M	Development of Cell-Penetrating R7 Fragment-Conjugated Helical Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription.	<i>Bioconjug Chem</i>	25(11)	1921-24	2014

Hirata N, Yamada S, Shoda T, Kurihara M, <u>Sekino Y</u> , Kanda Y	Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation.	<i>Nat Commun</i>	5	4806	2014
Yamazaki H, Kojima N, Kato K, Hirose H, Iwasaki T, Mizui T, Takahashi H, Hanamura K, Roppongi RT, Koibuchi N, <u>Sekino Y</u> , Mori N, Shirao T	Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines.	<i>J Neurochem</i>	128(4)	507-22	2014
Irie T, Matsuzaki Y, <u>Sekino Y</u> , Hirai H	Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells.	<i>J Physiol</i>	592(Pt 1) 34	229-47	2014
Fujimori K., Takaki J, Miura M, Shigemoto-Mogami Y, <u>Sekino Y</u> , Suzuki T, Sato K	Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation	<i>J Pharmacol Sci</i>			in press
Shigemoto-Mogami Y, Fujimori K, Ikarashi Y, Hirose A, <u>Sekino Y</u> , Sato K	Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells.	<i>Fundam Toxicol Sci</i>	1(3)	87-94	2014
Kim SR, Kubo T, Hojo M, Matsuo T, Miyajima A, Usami M, <u>Sekino Y</u> , Matsushita T, Ishida S	Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in human.	<i>J Toxicol Sci</i>	39(5)	717-23	2014
Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara Y, <u>Sekino Y</u> , Kanda Y	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells.	<i>Sci Rep</i>	4	5952	2014