

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

<国内学会>

1. 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)

2. 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)
3. 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)

<国際学会>

1. 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)
2. Miyamoto N, The application of iPSC-derived differentiated cells for drug safety evaluation. ISN satellite symposium (2014. 9) (Tokyo, Japan)
3. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Figure 1

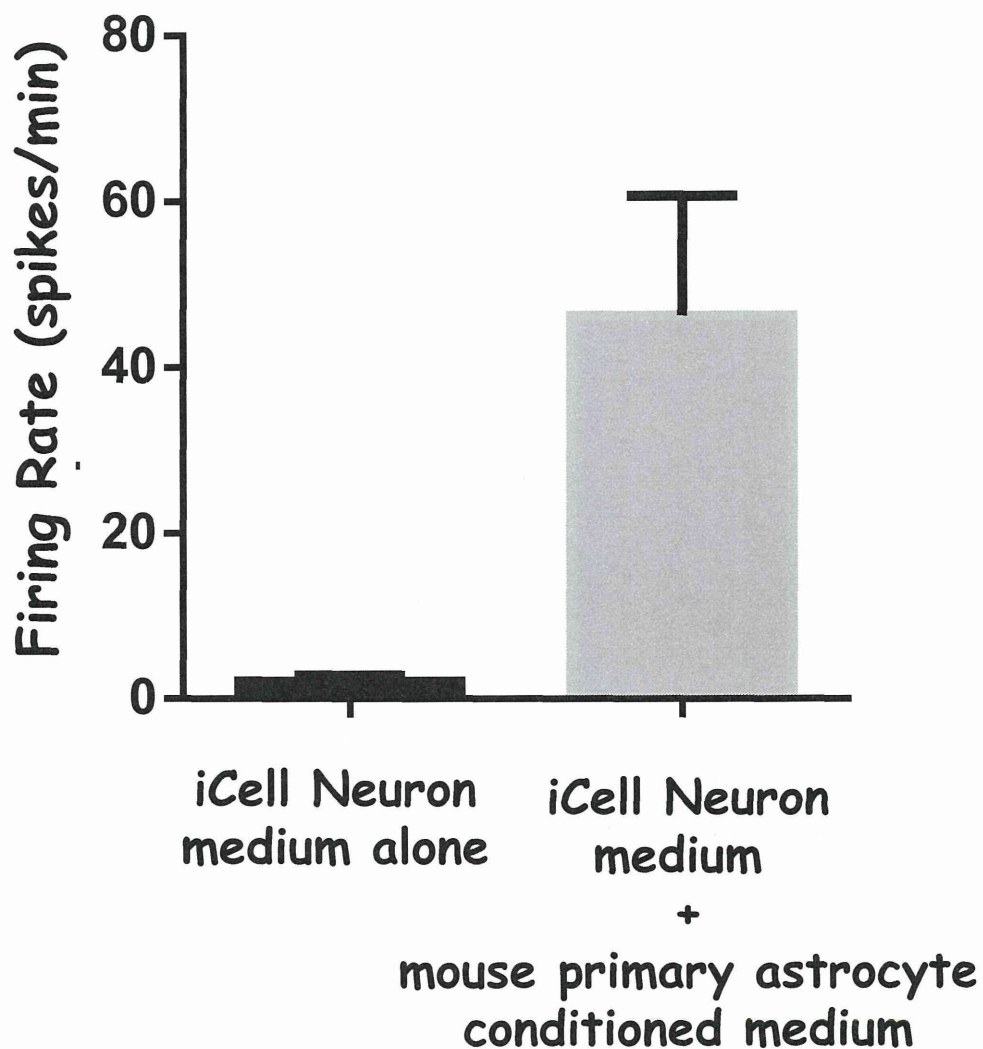


Fig. 1 Astrocyte-derived extrinsic stimuli generate spontaneous spikes in iCell Neurons

Baseline spontaneous electrophysiological activity readout by MEA from iCell neurons cultured with iCell Neurons maintenance medium alone or iCell Neurons maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium for 63 days. Baseline spike numbers were determined by using 100 nM TTX treated background value correlated with RSM value at 550. Probes over 1 Hz of recorded electrically evoked signals were selected as neuron positive probes.

Figure 2

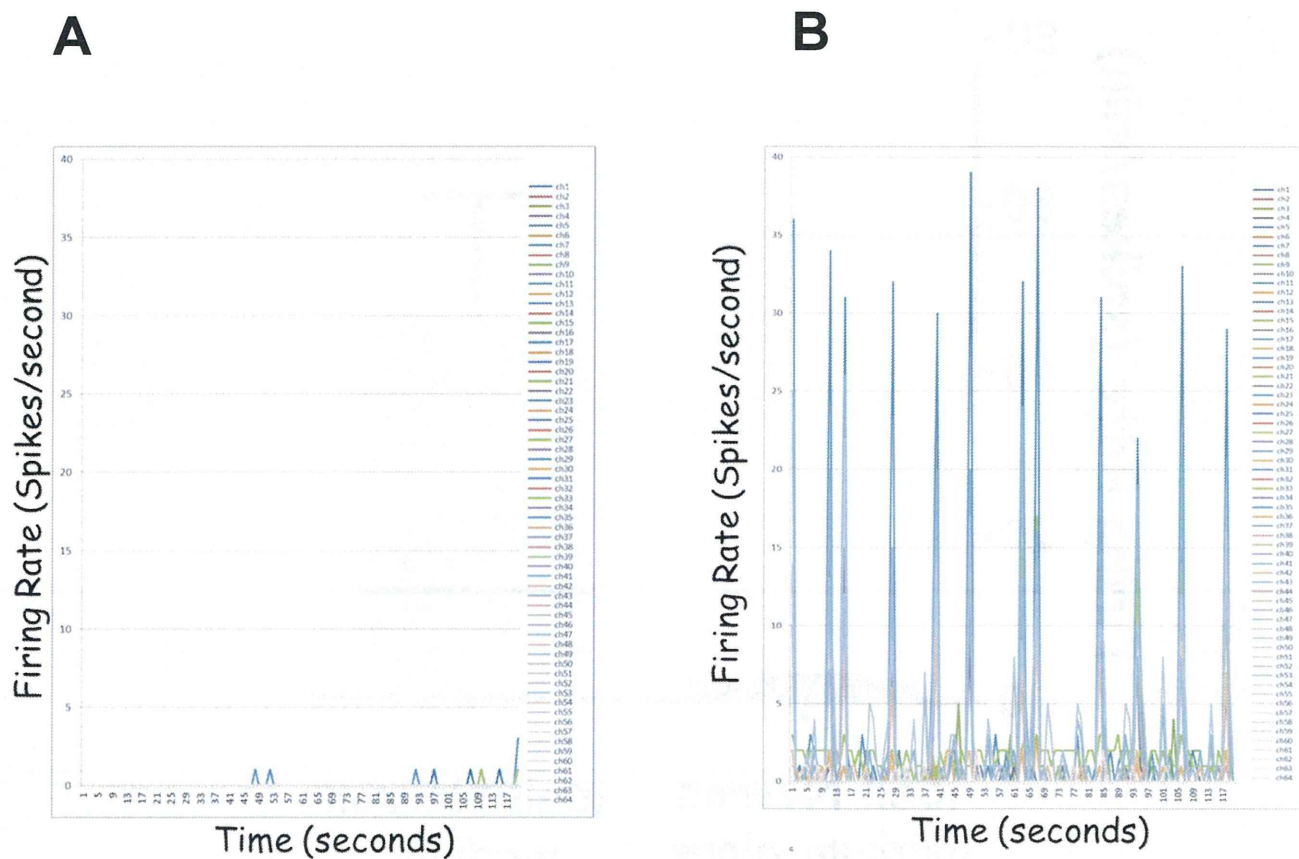


Fig. 2 The astrocyte-derived extrinsic stimuli induced periodic spontaneous synchronized burst spikes in iCell Neurons

Total spontaneous firing rate (spike numbers per second) from each electrode probe in a recorded 64-electrode probe dish are shown. Baseline spontaneous electrophysiological activity was recorded by MEA from iCell Neurons cultured in iCell neuron maintenance medium alone (A) or iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium (B) for 63 days. Periodic increased numbers of spikes were observed only in B. The periodic burst spikes were synchronized among multiple electrode probes. Baseline spike numbers were determined by using 100 nM TTX treated background value correlated with RSM value at 550..

Figure 3

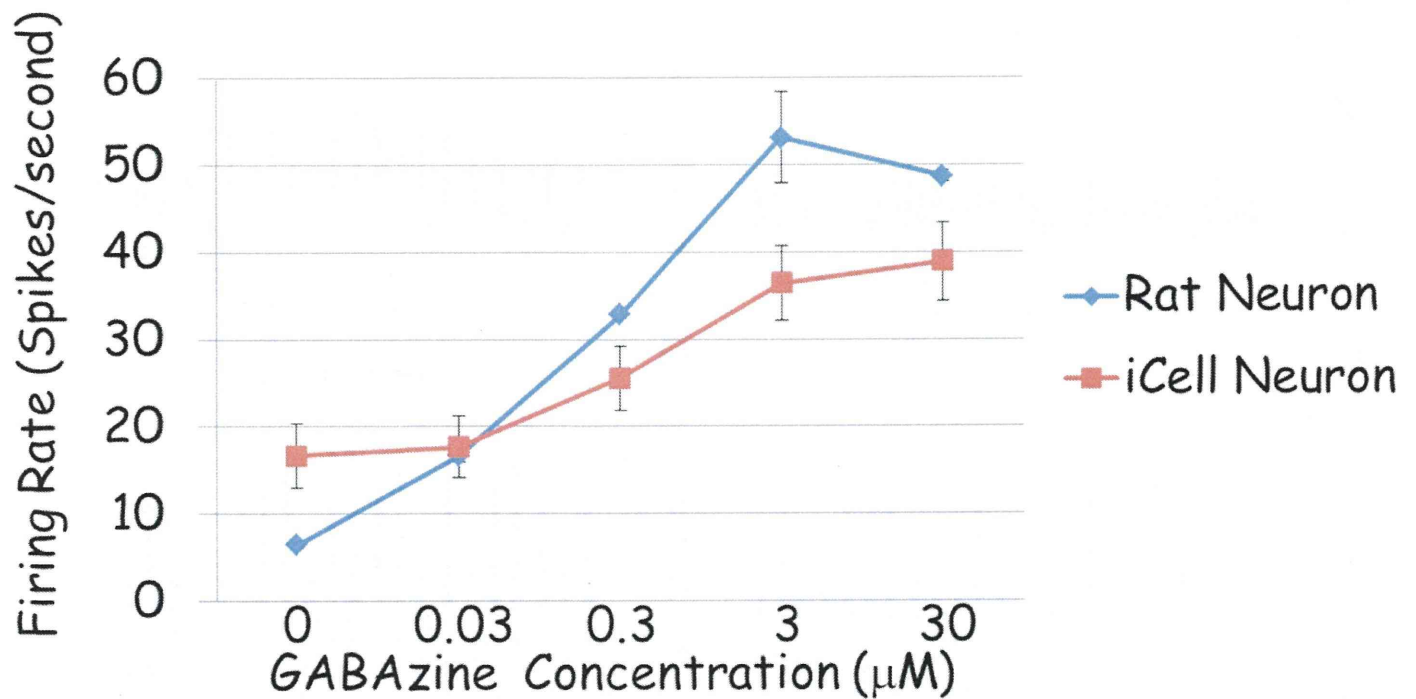


Fig. 3 GABAzine enhances spontaneous spike activity dose-dependent manners in rat primary cortical neurons and iCell Neurons

GABAzine was applied to the rat cortical primary neurons and iCell Neurons. iCell Neurons were supplied with astrocyte-conditioned medium for 2 months. The baseline activity was determined by subtraction of background value which was determined after 100 nM TTX treatment. Probes over 1 Hz of spike numbers were selected to data analysis. Dose-dependent mean spike responses are shown at the concentration of 0, 0.03, 0.3, 3 and 30 µM of GABAzine.

Figure 4

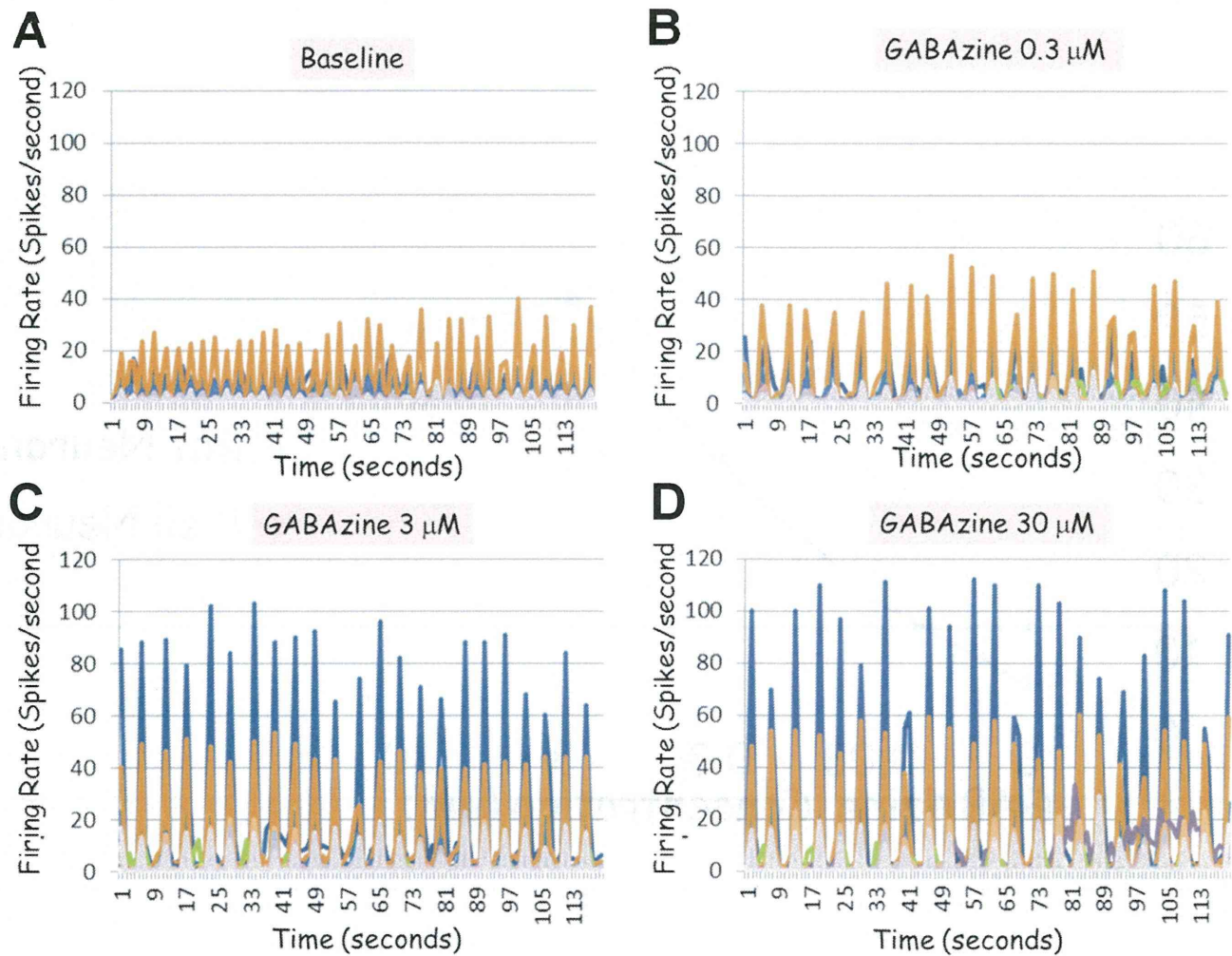


Fig. 4 GABAzine enhanced periodic synchronized burst spikes dose-dependent manner in iCell Neurons

The spontaneous spikes were monitored by MEA from iCell Neurons cultured in iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium for 2 months. Baseline spike numbers were determined by using 100 nM TTX treated background value (A). Altered baseline spike numbers are shown after 3 min treatment with 0.3 μ M (B), 3 μ M (C) and 30 μ M (D) of GABAzine.

Figure 5

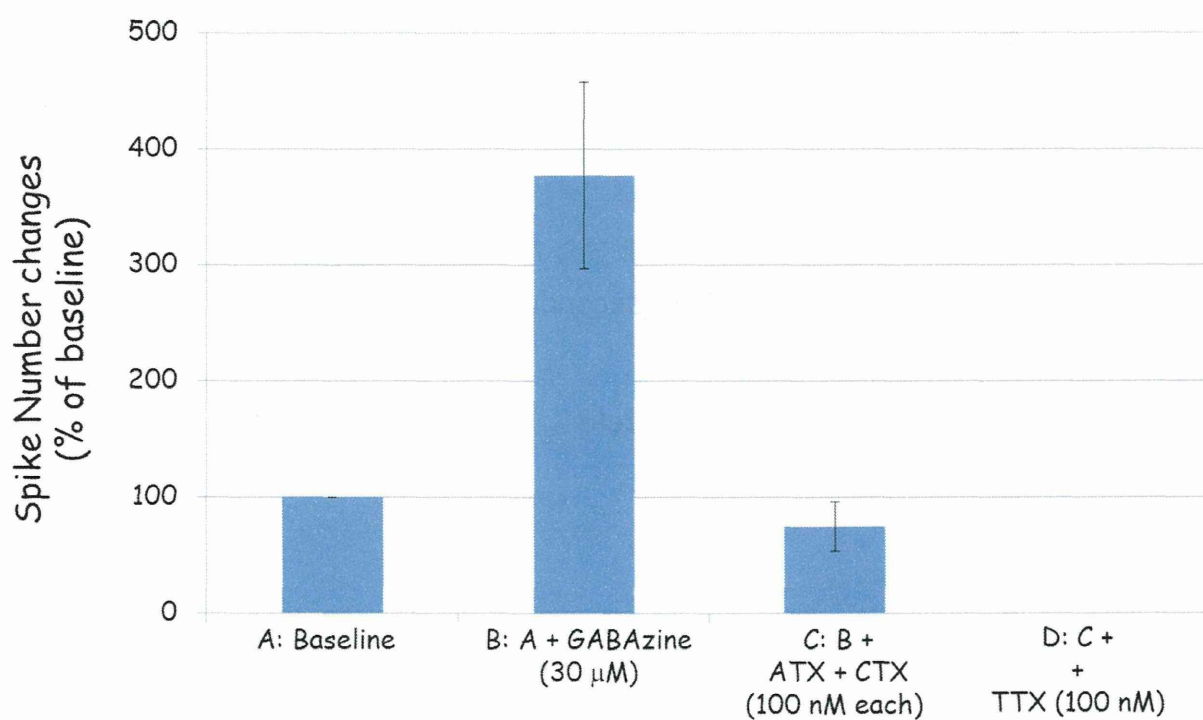


Fig. 5 Synchronized burst spikes are eliminated by neurotransmitter release blockers

The spontaneous spikes were monitored by MEA from iCell Neurons cultured in iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium for 2 months. Baseline spike numbers were determined by using 100 nM TTX treated background value (A). Altered baseline spike numbers are shown after 3 min treatment with 30 μM GABAzine (B), and simultaneous addition of 100 nM ω -agatoxin (ATX) and 100 nM ω -conotoxin (CTX), then followed by the addition of 100 nM of TTX (D).

Figure 6

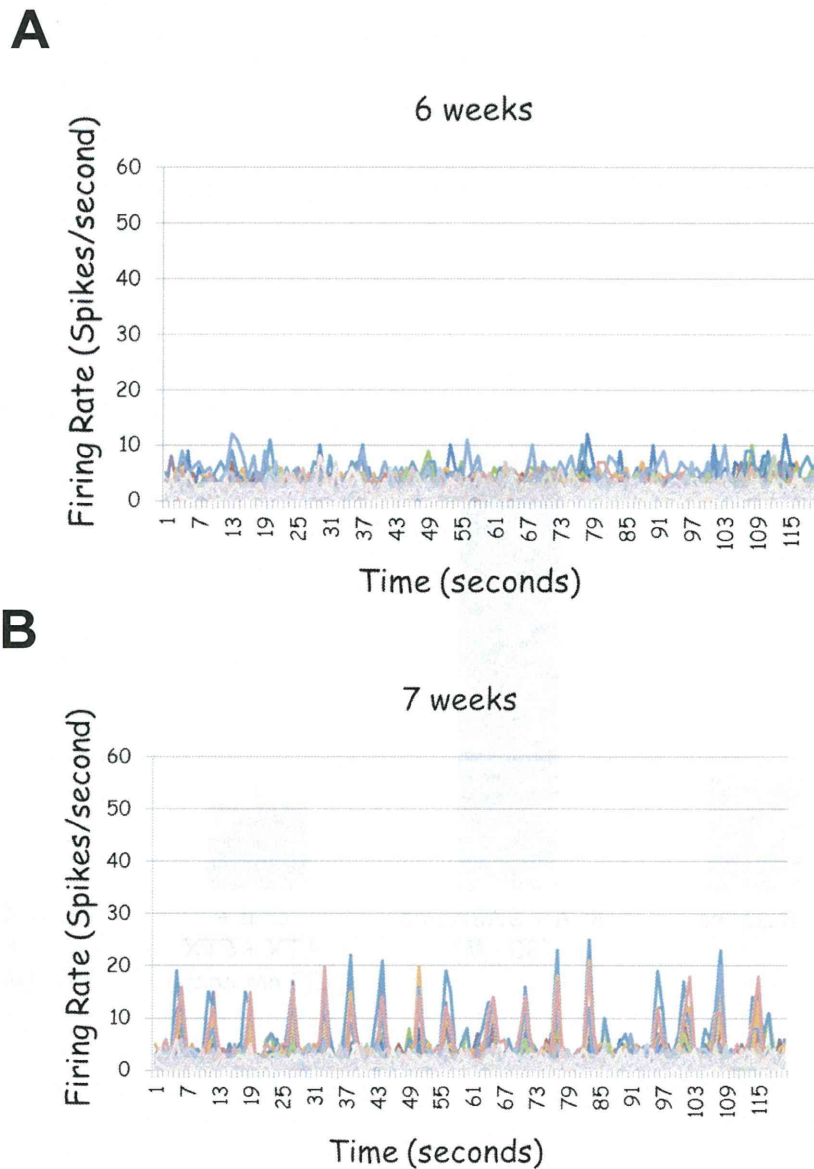
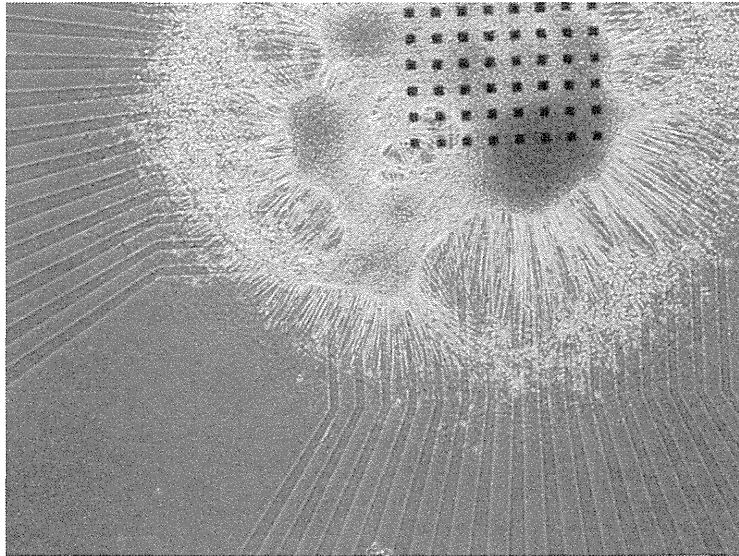


Fig. 6 The periodic spontaneous synchronized burst spike generation is required for more than 6 weeks with astrocyte's stimuli

The spontaneous spikes were monitored by MEA every week from iCell neurons cultured in iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium. Baseline spike numbers were determined by the value of RMS400 with untreated signals. Periodic synchronized burst spikes among multiple probes weren't observed in 6 weeks (A), but was observed from 7 weeks cultured iCell Neurons (B).

Figure 7

A



B

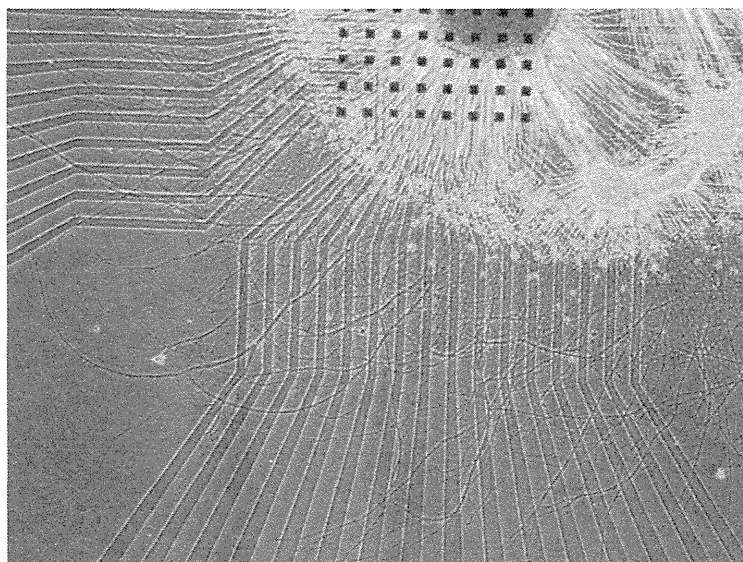


Fig. 7 Neurite outgrowth of iCell Neurons are potently enhanced by human iPS Ccll-derived astrocyte-conditioned medium

iCell Neurons were cultured in iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium (A) or human iPS Ccll-derived astrocyte-conditioned medium (B) for a week. Neurite outgrowth was observed by microscopy.

Figure 8

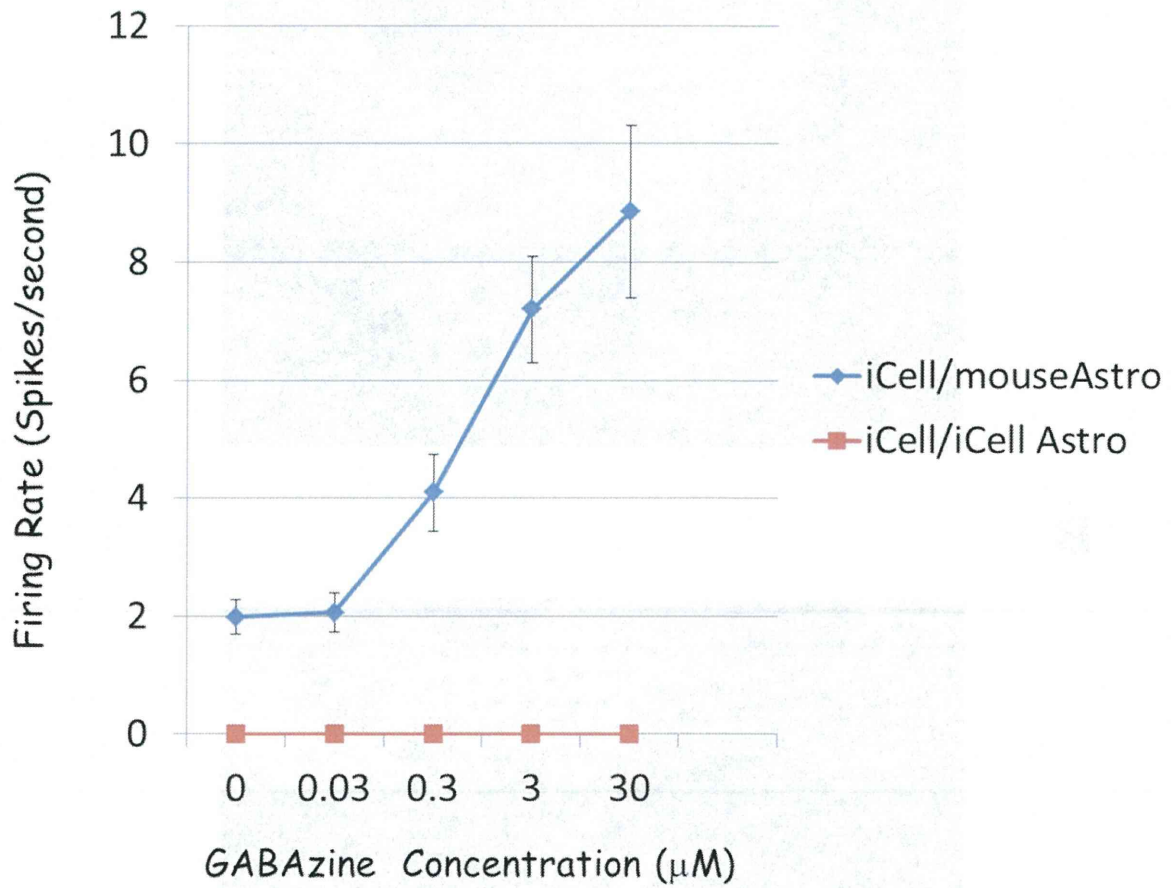


Fig. 8 Human iPS Cell-derived astrocyte-conditioned medium could not generate spontaneous spikes in iCell Neurons

iCell Neurons were cultured in iCell neuron maintenance medium with mouse astrocyte-conditioned medium or human iPS Cell-derived astrocyte-conditioned medium for 2 months. The baseline activity was determined by subtraction of background value which was determined after 100 nM TTX treatment. Probes over 1 Hz of spike numbers were selected to data analysis.

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

担当責任者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長

研究要旨

安全性薬理評価に必要な脳機能メカニズムを備えたヒト多能性幹細胞細胞由来神経細胞（human induced pluripotent stem cell derived neuron: hiPSC-neuron）等の選抜プロトコルを整備し、候補となる標本について選抜試験を開始した。Repro-Glu はグルタミン酸（L-glutamate: L-Glu）作働性神経細胞をメインとする hiPSC-neuron として市販されている。GABA 作働性神経細胞の含有率から前脳にむけて分化が進んだ標本であることを確認した。しかし、L-Glu への反応が現れるまでに 28 日以上培養が必要であり、L-Glu 反応性細胞の含有率が低い。本標本を安全性薬理評価試験に実用するためには培養条件の再検討やグリア細胞活用により神経機能発現の促進を図る必要がある。また、新たなラインの選抜を継続する必要があることがわかった。

一方、脳において神経細胞の最終機能分化には周囲のグリア細胞が重要な役割を果たしていることが明らかと成りつつある。そこで、グリア細胞由来因子を応用した hiPSC-neuron の最終分化、神経機能発現促進法の開発に取り組んだ。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。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

高橋華奈子

最上由香里

中條かおり

A. 研究目的

中枢神経系の副作用は予測困難なものが多く、新規医薬品候補化合物のうち臨床試験後期や市場から脱落する数は心毒性に続いて多いため、医薬品開発の障害となっている。医薬品の安全性薬理試験のコアバッテリー（ICH S7）には、医薬品候補化合物

の中枢神経系への影響を実験動物の全身症状と行動観察により評価することが定めら

れているが、行動観察による評価法は客観性やヒト予測精度に限界がある。しかし、神経科学技術の進歩とともに、脳機能基盤である認知機能のシナプス分子メカニズム、神経活動—神経形態—電気活動パターン連関が *in vitro* 実験により明らかとなり、医薬品による認知機能や神経活動への有害事象が *in vitro* 実験で可視化・数値化できるようになった。一方、ヒト iPS 細胞由来分化細胞は、*in vitro* での非臨床試験においてヒト特異的有害反応の予測に応用が期待される。そこで本研究事業の全体計画では、

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、ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (hiPSC-neuron) 等を用いた医薬品 *in vitro* 安全性評価法を開発することを目的とする。さらに多施設間バリデーションにより再現性の良い評価法にすることを目的とする。

平成 26 年度、当班では安全性薬理評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜プロトコルを整備し、候補となる標本について選抜試験を行った。また、脳において神経細胞の最終機能分化には周囲のグリア細胞が重要な役割を果たしていることが明らかと成りつつある。そこで、グリア細胞由来因子を応用した、hiPSC-neuron の最終分化、神経機能発現促進法の開発に取り組んだ。特に本年度はグリア由来因子 X の有用性について検討した (論文発表前のため、X と表記する。)

B. 研究方法

hiPSC-neuron の培養

・ Repro-Glu(ReproCELL)

ReproCELL (Repro) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Repro-Glu) を、 7.5×10^4 cells/cm² の割合で、ポリ-d-リジン/ラミニンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、Aditive A (Repro) を添加した Maturation 培地 (Repro) を用いて分化誘導を行った。

・ iCell Neuron (iNeuron) (CDI)

Cellular Dynamics International (CDI) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (iCell® Neurons: iNeuron) を、 7.5×10^4 cells/cm² の割合で、ポリ-d-リジン/ラミニンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、iNeuron 培地 supplement (CDI) を添加した iNeuron maintenance 培地 (CDI)

を用いて培養を継続した。実験に応じて、播種 4 日目からグリア由来因子 X を 5 日間添加して培養した。

Fura-2 Ca²⁺ イメージング

細胞は、ポリオルニチンフィブロネクチンコートした 8 ウェルスライドチャンバーに播種し、経日的に分化誘導した後、Ca²⁺ 応答実験に用いた。Ca²⁺ プローブ Fura2-AM 10 μM を室温、45 分間処置し細胞内に取り込ませた。Ca²⁺ 解析装置 AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) を用いて、励起波長 340nm/380nm 蛍光波長 510nm により得られた Fura2 蛍光像より蛍光強度の比を算出した。

Fura-2 Ca²⁺ イメージング系を用いた薬理実験

各種薬理実験は、Buffer saline solution (BSS) 中、灌流システムを用いて (2.0 ml / min) 行った。薬理実験は以下の手順で行った。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、②ATP (100 μM), L-Glu (100 μM), GABA (100 μM), HighK⁺ (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 (NMDA receptor antagonis) 単独あるいは AP-5 と DNQX (AMPA/KA receptor antagonist) のカクテルが L-Glu への反応に影響を与える可動化を検討することにより、L-Glu 受容体サブタイプを同定する、の 3 段階の実験である。薬物流入後、流入前に比較して 5% 以上の Ca²⁺ 流入の変化が認められた場合に影響有り、と判断した。

免疫組織化学的検討

培養 1-28 日目の標本について細胞組成を確認するため、免疫組織化学的に β3 tubulin, Nesting, GFAP の発現を確認した。平滑筋細胞があるかどうかについて α

smooth muscle actin 1 (α SM1) の発現を確認した。GABA 作働性神経細胞の含有率を確認するため、Tuj1、GABA を共染色した。シナプス成熟マーカーの発現およびその分布についても検討を行った。前シナプス部の成熟を検討するため Vglut2, Synapsin 1、後シナプス部の成熟を検討するために MAP2, drebrin について検討した。必要に応じて視野中細胞数を確認するため Hoechst33342 を用いて核染色を行った。観察画像はすべて Nikon 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 により取得した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。Neurosphere に関しては、分化済み細胞塊であるため、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会より平成 23 年 1 月 31 日に倫理審査非該当と判定された。ストックバイアルは施設可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレーブし廃棄した。

C. 研究結果

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. 1 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^{2+} 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 μ M), L-Glu (100 μ M), GABA (100 μ M), HighK⁺ (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. 2 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^{2+} チャンネルを発現している細胞は 80 mM の high K⁺ に反応するので、細胞が確かに生存していることを high K⁺ 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. 2A)。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. 2B に典型的な 28 日目の Ca^{2+} 流入トレースを示す。細胞への Ca^{2+} 流入量は非常に小さかった。L-Glu への Ca^{2+} 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. 3)。L-Glu が引き起こす Ca^{2+} 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^{2+} 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^{2+} 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. 4)、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 β (アストロサイトに存在する Ca²⁺ 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. 5)。S100 β (+)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. 6)。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-neuorn の場合、標本によっては神経系以外の細胞が誘導されることがある。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 α -sm1 の発現を確認することにより検討した (Fig. 7)。14 日目には well の全

体に α -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. 8)。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. 8A, 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. 9)。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. 8A, 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^{2+} 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^{2+} 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 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 Ca^{2+} 流入を減弱させた (Fig. 10A)。両群ともに AP-5 + DNQX 処理で L-Glu による 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 Ca^{2+} 流入トレースを Fig. 10B 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 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. 10C)。

D. 考察

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^{2+} 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こ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^{2+} 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

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. Sato K, Microglia effects on neuronal development, GLIA (in press) (C.A.)
2. 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 Pharmcol Sci (in press) (C.A.)
3. Shigemoto-Mogami Y, Fujimori K, Ikarashi Y, Hirose A, Sekino Y, Sato K, Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells. Fundam Toxcol Sci, 1(3), 87-94 (2014) (C.A.)
4. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K, (2014) 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. Sato K, Microglia enhance 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
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 細胞由来神経細胞の探索、日本薬学会 第 135 年会 (2015.3) (神戸)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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向けて (2014.12) (東京)
10. 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」解決に向けて— Human neuronal circuitry on dish は実現できるのか」(オーガナイザー) (2014.10) (東京)
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会・第 57 回 日本神経化学会大会合同大会 (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会・第 57 回 日本神経化学会大会合同大会 (2014.9, 奈良)
 19. 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)
 20. 佐藤 薫、ヒト iPS 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)
 21. 佐藤 薫、ヒト iPS 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)
 22. 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 iPS 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)
 23. 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)
- <国際学会>
1. 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)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
5. 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)
 6. 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)
 7. Sato K, Sequential expression of various receptors along with the differentiation of human iPSC-derived neurons, ISN satellite symposium (2014,9) (Tokyo, Japan)
 8. Sato K, Shigemoto-Mogami Y,
- 該当無し

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)

9. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

Figure 1

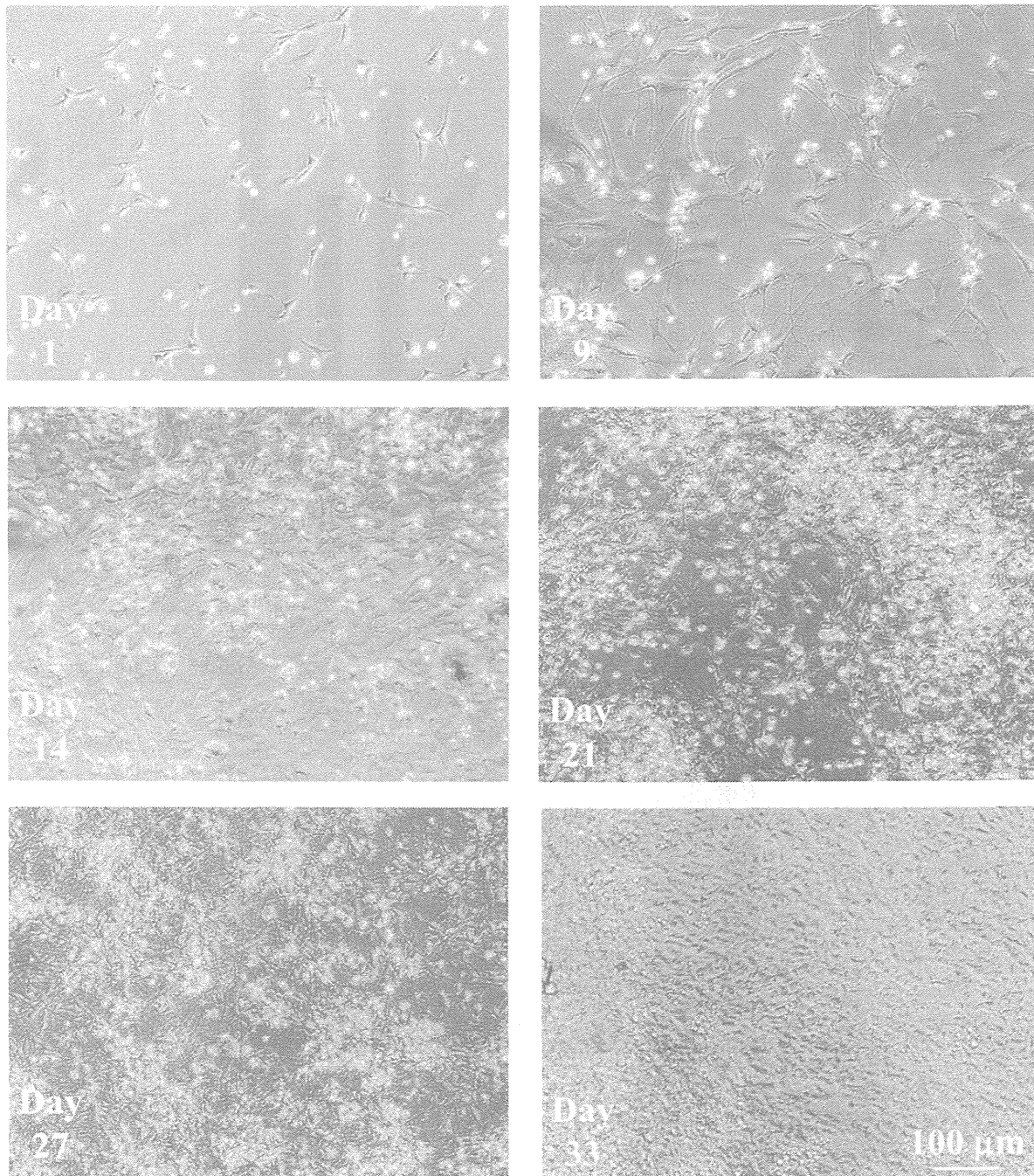


Fig. 1 Phase-contrast images of Repro-Glu until DIV33
The proliferation of the cells became remarkable at DIV14. After DIV27, it became hard to discriminate the morphology of each cell.

Figure 2

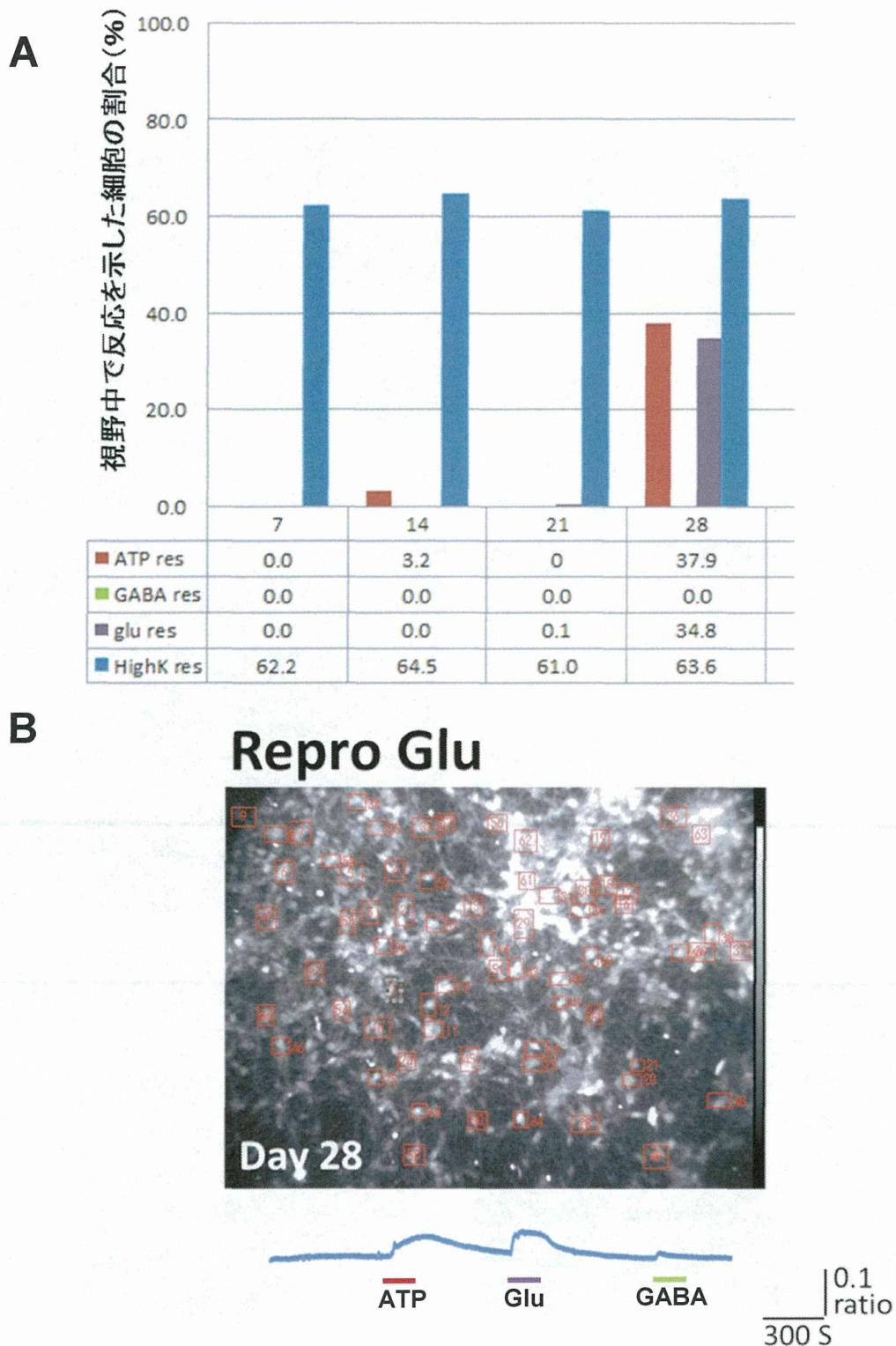


Fig. 2 Ca^{2+} responses of Repro-Glu to ATP, L-Glu, and GABA.

- A. Time course of the responses. The cells did not respond to the ligands until day 21. On day 28, there appeared the cells which responded to ATP (100 μM) and L-Glu (100 μM). The responses to GABA (100 μM) was not observed.
- B. The typical Ca^{2+} influx traces of Repro-Glu on day 28.