

図 5. ラット神経堤細胞の増殖に及ぼすトリブチルスズ (tributyltin) の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 18 時間で神経管を除去し、培養 24 時間目からバルプロ酸を培養液に添加した。培養 24 時間と 48 時間の細胞数の比 (48 時間の細胞数/24 時間の細胞数) を、平均値と標準誤差で示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ )。

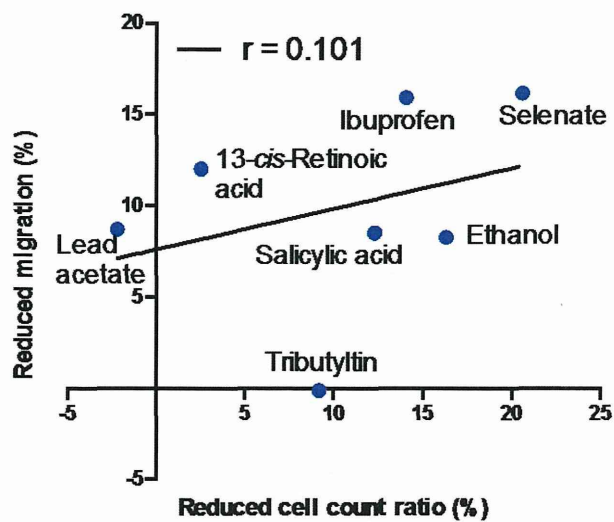


図 6. ラット神経堤細胞における遊走阻害作用の増殖阻害作用に対するプロット  
 ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養開始時から化学物質を培養液に添加した。すべての化学物質のプロットを対象とした回帰直線と相関係数を示した。

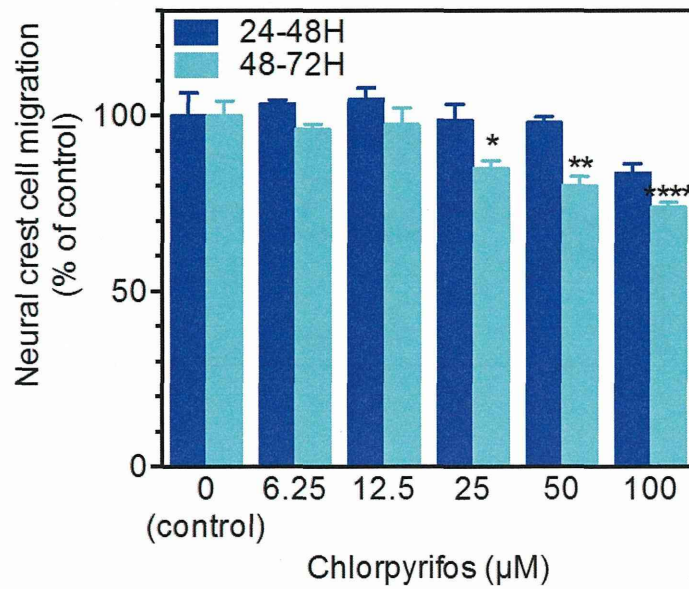


図 7. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ )。

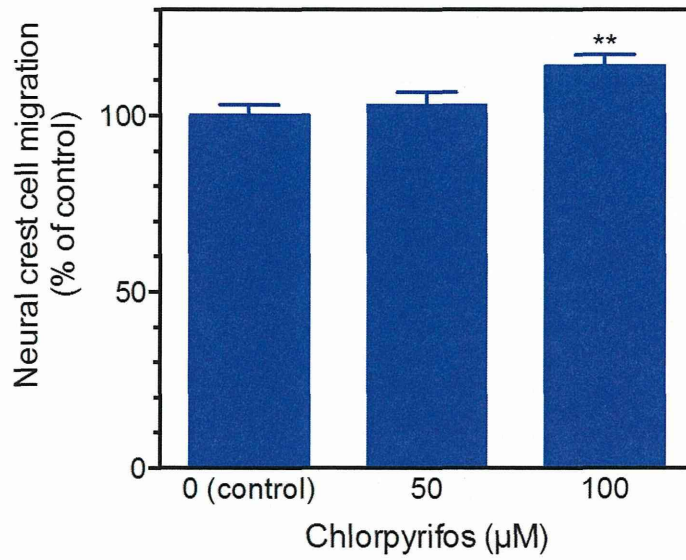


図 8. ラット神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 48 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。「\*」は対照群と比較して統計学的な有意差があることを示す (\*\*  $p < 0.01$ )。神経管を培養 18 時間目に除去した。

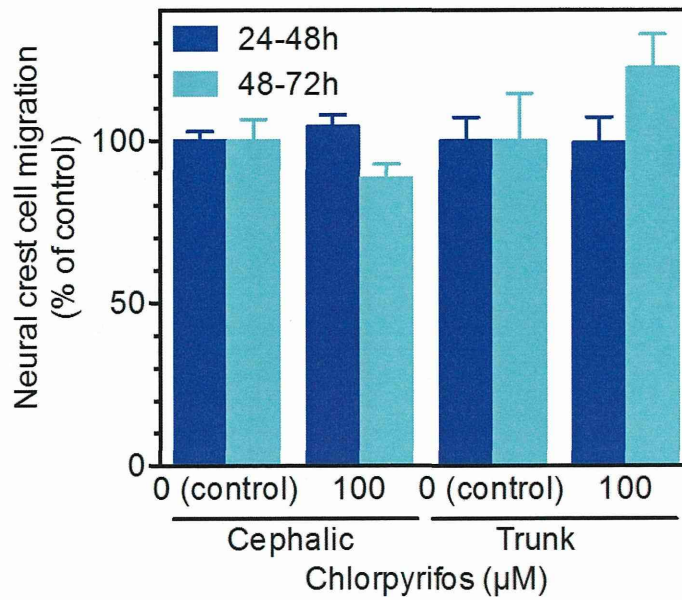


図 9. ラット頭部 (cephalic) および腹部 (trunk) 神経堤細胞の遊走に及ぼすクロルピリホス (chlorpyrifos) の影響

ラット 10.5 日の神経管から遊走する神経堤細胞を 72 時間培養した。培養 24 時間目からクロルピリホスを培養液に添加した。平均値と標準誤差を示す。神経管を培養 18 時間目に除去した。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

発達成長期神経系細胞新生への化学物質の影響評価

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長  
佐藤 薫

要旨

前脳矢状切片の脳室下帯（subventricular zone: SVZ）に存在する神経幹細胞および前駆細胞を蛍光標識し切片培養を行い、評価化合物を適用し神経系細胞の新生と遊走に対する影響について定量的な評価を行った。被験化合物はバルプロ酸（valproic acid: VPA）、tricostatin A（TSA）、valpromide（VPM）、suberoylanilide hydroxamic acid（SAHA）、有機スズ（tributyltin: TBT）、クロルピリホスである。VPA が生後初期 SVZ の新生細胞数を非特異的に増加させる事を見いだした。VPA が遊走中細胞の突起伸張を促進する可能性を見いだした。VPA と同様にヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase: HDAC）阻害作用を持つ TSA, SAHA で同様の作用がみられたことから、この作用に HDAC 阻害作用が関与していることが示唆された。有機スズ（tributyltin: TBT）は 100 nM から神経系細胞新生を劇的に抑制することを明らかとした。また、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制影響がある可能性が示された。

A. 目的

発達期の神経系は成体より化学物質に対する感受性が高く、健康被害が長期間あるいは遅発性に生じることが考えられるため、子どもの健康を守るためにも簡便かつ低コストの試験法＝in vitro 評価系を開発する必要がある。生後初期の SVZ では神経系細胞新生が活発に起こっている。特にミエリン鞘を形成するオリゴデンドロサイト細胞は生後初期にはほぼすべての細胞新生が起こる。そのため、幼児期の抗がん剤使用は重篤な知能障害を引き起こすことが知られており、現在では幼児期の使用は禁忌となっている。従って、この時期の神経系細胞新生、オリゴデンドロサイト新生における化学物質リスクを明らかにすることは大変重要であり、このための in vitro 評価系確立が急がれる。我々は平成 22-24 年度の化学物質リスク事業「個体の成長期における神経系および肝臓系細胞の機能解析による化学物質の健康影響評価法に関する研究」において、生後 2-3 日齢の前脳矢状面切片培養系の SVZ に含まれる神経幹細胞および前駆細胞を緑色蛍光蛋白質（enhanced Green Fluorescent

Protein: eGFP）によりピンポイントで標識し、免疫組織化学的検討と組み合わせることにより神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する化学物質の影響を評価可能とした。平成 25-27 年度は、この技術を用いて、バルプロ酸（valproic acid: VPA）、tricostatin A（TSA）、valpromide（VPM）、suberoylanilide hydroxamic acid（SAHA）、有機スズ（tributyltin: TBT）、クロルピリホスの神経系細胞新生、オリゴデンドロサイト新生に対する影響評価を行った。

B. 研究方法

1. 前脳矢状面切片培養系

生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片標本（150µm）を作成しトランスメンブレン（Millipore）上に静置し、eGFP tag を組み込んだ改変型レトロウイルス（NIT-eGFP; J Neurosci 19 (19) 8487-97, 1999）を SVZ に 30 nl ピンポイントで滴下することにより、局所的に神経幹細胞および前駆細胞を標識した。その後、切片培養用培地（N2 1%, B27 1%, L-glutamine 2 mM,

D-glucose 33.3 mM, Kynurenic acid 0.5 mM in Neurobasal) で 3 日間培養した。

## 2. 前脳矢状面培養切片の免疫組織化学的検討

eGFP 標識細胞の O1 (オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー) 発現について免疫組織化学的に検討した。ブロッキング液で 1 時間処理した後、4°C で抗 O1 抗体 (IgM) (Millipore [Chemicon] MAB344) により 2 日間処理し、PBS で 3 回洗浄した後、蛍光標識された二次抗体で 2 日間処理し (4°C)、PBS で洗浄した。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の比率 (%) を算出した。

## 3. eGFP 標識細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討

ピンポイントで eGFP で標識された神経幹細胞および神経系前駆細胞を SVZ に持つ前脳矢状面切片を VPA (120 μM, 1.2 mM)、trichostatin A (TSA) (10 nM-1 μM)、valpromide (VPM) (120 μM, 1.2 mM) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (10-100 nM)、TBT (1 nM-1 μM)、クロルピリホス (1-100 μM) 存在下で 3 日間培養し、新生細胞の増殖と遊走、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と遊走に対する作用を検討した。

(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「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

## C. 研究結果

### 1. VPA

SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群 (神経幹細胞および前駆細胞) を含む培養前脳矢状面切片を VPA (120 μM, 1.2 mM) で 3 日間処理した (3 日間) (図 1)。eGFP(+) 細胞 (新生神経系細胞)、eGFP(+)O1(+) 細胞 (オリゴデンドロサイト前駆細胞) の遊走範囲は VPA 1.2 mM において増加傾向が見られた (図 1A)。興味深いことに、eGFP(+) 細胞数は VPA によっ

て濃度依存的に増加した (図 1B、黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も VPA によって濃度依存的に増加した (図 1B、黄色カラム)。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合を計測したところ、VPA によって影響を受けていなかった (図 1C)。VPA は遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした (図 2)。コントロール群では、遊走中細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、1.2 mM VPA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

### 2. TSA

VPA はヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害作用が有名である (J.Biol.Chem. 276, 36734-, 2001)。そこで、HDAC 阻害作用と 1 で得られた VPA の作用との関連について、より強力な HDAC inhibitor である TSA を用いて検討した。培養前脳矢状面切片を TSA 処理した (10 nM-1 μM) (3 日間)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は TSA 10 nM では増加傾向にあり、1 μM では減少傾向にあった (図 3A)。10 nM で eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を増加させる傾向が見られたが有意な差には至らなかった (図 3B)。100 nM 以上の濃度では、逆に減少させる傾向が見られ、1 μM においては有意な減少が見られた。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合を計測したところ、TSA によって影響を受けていなかった (図 3C)。興味深いことに、TSA も遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした (図 4)。コントロール群では、遊走中細胞の突起は短く、ほぼ全ての細胞が円形であったが、100 nM TSA 処理群では観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

### 3. VPM

VPA の作用と HDAC 阻害作用との関連についてさらに確認するため、HDAC 阻害作用をもたない VPA アナログである VPM を用いて検討した。培養前脳矢状面切片を VPM (120 μM-1.2 mM) 処理した (3 日間)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は VPA によってほとんど変化しなかったが、1.2 mM において増加傾向が

見られた(図 5A)。eGFP(+) 細胞数は VPM によってほとんど影響をうけなかった。1.2 mM においてわずかな増加傾向を示したが、有意差には至らなかった(図 5B、黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数もほとんど影響を受けなかった(図 5B、黄色カラム)。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合を計測したところ、VPM によって影響を受けていなかった(図 5C)。VPM は遊走中細胞の形態にほとんど影響を与えなかった(図 6)。コントロール群、1.2 mM VPM 処理群ともに、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものが多数見受けられた。

#### 4. SAHA

強力な HDAC 阻害薬である SAHA (IC50: ~10 nM) の生後初期 SVZ 新生細胞に対する影響評価を行った培養前脳矢状面切片を SAHA (10-100 nM) 処理した(3日間)。図 7A は 3 日目の免疫蛍光染色画像における eGFP(+) 新生細胞(緑色)、O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞(赤)を示す。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は SAHA 10 nM において増加傾向が見られた。図 7B は培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を表す。eGFP(+) 細胞数に対する SAHA の作用はベルシェーブの結果となった(黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も eGFP(+) 細胞数と同様の変化を示した(黄色カラム)。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は SAHA によって減少する傾向にあったが有意な差には至らなかった(図 7C)。また、SAHA 10 nM はコントロール群に比較して、遊走中細胞の著しい突起伸展促進を引き起こした(図 8)。これらの作用はオリゴデンドロサイト前駆細胞に特異的ではなく、神経系新生細胞に対して非特異的に見受けられた。

#### 5. TBT

培養前脳矢状面切片を TBT (10-100 nM) 処理した(3日間)。図 9A は 3 日目の免疫蛍光染色画像における eGFP(+) 新生細胞(緑色)、O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞(赤)を示す。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は TBT 100 nM 以上で劇的に低下した。1  $\mu$ M においては生存新生細胞がほとんど確認されなかつ

た。図 9B は培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を表す。培養切片中 eGFP(+) 細胞数(黄土色カラム)、eGFP(+)O1(+) 細胞数(黄色カラム)は 100 nM 以上で劇的な減少が引き起こされた。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は 10 nM 以上で劇的な減少が起こった(図 9C)。これは、新生細胞の中でもオリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して特に感受性が高い可能性を示している。また、このときの矢状面切片が非常に崩れやすくなっていたことから、細胞種非特異的な毒性も存在することが考えられる。

#### 6. クロルピリホス

クロルピリホスは DMSO に溶解したため、まず DMSO の影響について検討した。

eGFP 標識された新生細胞群(神経幹細胞および前駆細胞)を SVZ に含む培養前脳矢状面切片をクロルピリホス適用時に想定される最高濃度の DMSO (0.05%) を含む培地で 3 日間培養したところ、eGFP(+) 細胞(神経幹細胞および前駆細胞)数、eGFP(+)O1(+) 細胞(新生オリゴデンドロサイト)数、新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合、これらの細胞の遊走に何ら影響はなかった(データ示さず)。

次に上記パラメーターに対するクロルピリホスの影響について検討した(図 10)。培養前脳切片をクロルピリホス入りの培地(final conc: 1-100 $\mu$ M)で3日間培養したところ、100  $\mu$ M クロルピリホス適用群では、培養前脳切片の膨潤がおこり切片の厚みが増していた。1-10 $\mu$ M においてはこのような変化は観察されなかった。クロルピリホス

(1-100 $\mu$ M) は eGFP(+) 細胞(神経幹細胞および前駆細胞)数を濃度依存的に減少させる傾向があった(図 10B, 黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞(新生オリゴデンドロサイト)数も減少の傾向を示したが、新生細胞全体の減少よりも小さな変化であった(図 10B, 黄色カラム)。新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合(eGFP(+)O1(+) cell No. / eGFP(+) cell No. \*100%)を算出し、クロルピリホスの作用を確認したところ、クロルピリホス 10 $\mu$ M まではほとんど影響がなかったが、100 $\mu$ M において新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合が増加の傾向を示した(図 10C)。新生細胞の遊走範囲



もクロルピリホスによって濃度依存的に減少した。これは、上記に示す新生細胞数の減少に矛盾しない結果となっている。

#### D. 考察

VPA は HDAC 阻害剤 (IC<sub>50</sub> = 400 μM) として抗がん作用、抗炎症作用、神経保護作用などを持つ (J.Biol.Chem. 276, 36734-, 2001)。また、GABA トランスアミナーゼ阻害作用があり、GABA レベルを上昇させるため抗てんかん作用もある。NMDA 受容体、Na<sup>+</sup> チャンネルを阻害することも報告されている (Folia Biologica 53, 37-, 2007)。さらに、A 阻害も阻害する (J.Exp.Med. 205, 2781-, 2008)。このように VPA は非常に多くの生体内分子と相互作用する薬剤であるが、現在は HDAC 阻害剤として実験的に広く使われる様になっている。本研究において、VPA は生後初期 SVZ の新生細胞数 (eGFP(+) 細胞) を増加させたが、オリゴデンドロサイト前駆細胞数 (eGFP(+)O1(+) 細胞数) の新生細胞中の割合に変化はなかった。この結果は VPA による eGFP(+) 細胞数増加は分裂細胞全体に対する作用であり、ある細胞種が特異的に影響を受けているわけではないことを示している。このような有意な新生細胞数の増加は HDAC 阻害剤である TSA, SAHA の低濃度領域でも見られており、HDAC 阻害作用の関与が考えられる。VPA は遊走中細胞の形態に大きな影響を与えることを見いだした。ほぼ全ての細胞で突起の伸張が促進されていた。同様の突起伸張促進作用は TSA、SAHA 適用標本によっても見受けられたが、VPM 適用によっては引き起こされなかった。以上のことから、VPA の突起伸張促進作用にも HDAC 阻害作用が関連していることが示唆される。今後はこの突起伸張促進作用が現れる細胞種を特定する必要がある。以上のデータは HDAC 阻害作用のある化合物が、生後初期神経系の新生細胞の遊走と分化に対してリスクを持つことを示している。これまで、HDAC と細胞の突起伸張との関連についてはほとんど報告がない。しかし、HDAC の細胞骨格系との相互作用については tubulin 系 (PLoS One. 2011, 6(6), e20696, 2011)、actin 系 (FASEB J. 19(8), 966-8, 2005) とともに報告がある。標的となっている分子およびメカニズムの解明については

さらなる検討が必要である。また、幼弱脳では epigenetic control が成熟脳よりもかかりやすいという報告もある (Nat Neurosci, 11(9), 1024-34, 2008)。今回見られた、HDAC 阻害剤による突起伸張促進作用についても、年齢依存性を検討する必要がある。

TBT が神経系細胞の新生、遊走と分化に対して阻害作用を持つことがわかった。TBT は活性酸素種生成による神経細胞障害作用が報告されている (Neurochem Int, 60(8) 782-90, 2012)。TBT 適用培養スライス全体が非常にもろく崩れやすくなっていたのはこのような非特異的な毒性作用によるものであると考えられる。また、non-NMDA 受容体や NMDA 受容体 (Toxicol Sci 89(1) 235-42, 2006, Br J Pharmacol 136(2) 201-6, 2002)、GABA 受容体 (J Pharmacol Ext Ther 299(1) 171-7, 2001) との相互作用も報告されており、今回見いだした遊走および分化の阻害作用との関連に興味を持たれる。我々は、新生細胞の中でも特にオリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して感受性が高いことを示すデータを得た。このような知見はこれまで報告がなく TBT の新たなリスクといえる。

クロルピリホスは有機リン酸系の殺虫剤であり、害虫の神経系アセチルコリンエステラーゼを阻害することにより作用を発揮するとされている。しかし、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用よりも低い濃度で注意や記憶を損なうことが、ヒト、動物でともに報告されている (J Appl Toxicol 1998, 18, 393-408; Toxicol Lett 2001, 120, 343-351; Toxicol Sci 2009, 109(1) 132-42)。このようにクロルピリホスは多岐にわたる作用メカニズムを持ち、その作用も多岐にわたることが予想されるが神経発達に対する影響はあまり知見がない。本研究では生後初期の神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する影響評価を前脳切片培養系を用いて行った。クロルピリホス (1-100μM) は eGFP(+) 細胞 (神経幹細胞および前駆細胞) 数を濃度依存的に減少させる傾向があった。また、新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの場合は100 μMにおいて新生細胞中の新生オリゴデンドロサイトの割合が増加の傾向を示した。従って、クロルピリホスはオリゴデンドロサイト以外の細胞に対して新生抑制を引き起こす可能性が示された。脳神経

系は主に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管系細胞で構成されているが、胎生期から生後にかけてクロルピリホスに暴露されたマウスは海馬の神経新生が低下することも報告されている (Reprod Toxicol 2013, 38, 25-36)。培養ヒトアストロサイト培養を用いた実験では、クロルピリホスがアストロサイトの炎症性活性化を引き起こすことが示されている (Toxicol Sci, 2006, 93(1) 125-35)。また、胎生期もしくは生後のクロルピリホスの *in vivo* 適用においては、グリア細胞新生時期に適用したときに最も発達阻害が誘発された (Environ Toxicol Pharmacol 2005, 19(3), 455-61)。また、胎生期暴露はアストロサイト活性化マーカーである GFAP 発現レベルを上昇させた (Brain Res Dev Brain Res 2002, 133(2), 151-61)。しかし、一方でオリゴデンドロサイト前駆細胞に対しても毒性が報告されている (Toxicology 2009, 259(1-2), 1-9)。細胞種によりクロルピリホスへの感受性が違っており、アストロサイトはその中でも感受性の高い細胞であることが考えられるが、細胞種による感受性の違いについては細胞種特異的なマーカーを用いて確認する必要がある。このような細胞毒性のメカニズムとして細胞骨格への影響が考えられる。クロルピリホスの長期的な投与により、軸索内輸送に影響があることが報告されている (Neurotoxicology 2015, 47, 17-26)。キネシンによる輸送 (Toxicol Appl Pharmacol 2007, 218, 20-29)、tubulin の修飾 (2008, Chem Biol Interact 175, 180-186)、微小管形成阻害作用なども明らかとなっている (Neuroscience 2007, 146, 330-339)。さらに、胎児新皮質において細胞分裂面が垂直から水平に移行する作用も報告されており、このような分裂面の角度が細胞の運命決定に影響を及ぼす可能性も示唆されている (PLoS One 2014, 9 (4) e95343)。さらに、ヒト胎生幹細胞由来神経幹細胞においてはクロルピリホスによって NF- $\kappa$ B 活性化を介したアポトーシスが誘導されること (Neurotoxicology 2014 42, 58-70)、ミトコンドリア長が増加するとともにその数が減ることも報告されており (J Pharmacol Exp Ther 2011, 399(2) 341-9)、直接的なアポトーシス誘導作用を持つ可能

性も考えられる。クロルピリホスは高濃度領域 (100 $\mu$ M) において培養前脳切片の膨潤を引き起こした。これまでこのような報告はなく、新たなメカニズムを考慮に入れながら今後の検討を進める必要がある。

## E. 結論

HDAC 阻害作用をもつ化学物質が新生神経系細胞数増加、新生細胞の突起発達を引き起こす可能性があることを明らかとした。TBT が神経系細胞新生を劇的に抑制する可能性が示された。特に、オリゴデンドロサイト前駆細胞が TBT に対して感受性が高いことが示唆された。クロルピリホスは新生細胞数、新生オリゴデンドロサイト数、遊走面積ともに濃度依存的に減少させたが、その作用はオリゴデンドロサイト以外の細胞が標的となっている可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Ohara, Y., Koganezawa, N., Yamazaki, H., Roppongi, R. T., Sato, K., Sekino, Y., Shirao, T. (2015) Early-stage development of human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. *J Neurosci Res* 93(12): 1804-13.
- [2] 佐藤 薫. (2015) ミクログリアの発生と分化. *Clinical Neuroscience* 32(12) 1338-1341.
- [3] Sato, K. (2015) Microglia effects on neuronal development. *GLIA* 63(8): 1394-495.
- [4] Fujimori, K., Takaki, J., Miura, M., Shigemoto-Mogami, Y., Sekino, Y., Suzuki, T., Sato, K. (2015) Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation. *J Pharmacol Sci*, 127(1) 145-9.
- [5] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Microglia enhances neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(5): 2231-2243.
- [6] Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Ikarashi, Y., Hirose, A., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Residual metals in carbon nanotubes suppress the

- proliferation of neural stem cells. *Fundam Toxcol Sci*, 1(3): 87-94.
- [7] Takahashi K., Ishii-Nozawa R., Takeuchi K., Nakazawa K., Sekino Y. and Sato K. 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 (2013).
- [8] Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T. and Sato K. 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 (2013).
- [9] Kinoshita M., Nasu-Tada K., Fujishita K., Sato K. and Koizumi S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1): 47-58 (2013).
2. 学会発表
- [1] 高橋華奈子、最上(重本)由香里、清水英雄、中條かおり、干川和枝、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機能的 NMDA 受容体発現とグルタミン酸興奮毒性発現の株間比較、日本薬学会第 136 年会 (2016, 3, 横浜)
- [2] 重本—最上 由香里、片倉 明日美、長谷川 陽介、関野 祐子、田辺 光男、佐藤 薫: 神経幹細胞塊から機能的神経細胞を効率的に分化誘導するプロトコルの検討と分化に伴う機能的受容体分布変化、日本薬学会第 136 年会 (2016, 3, 横浜)
- [3] 佐藤 薫: ミクログリアの中枢神経系発達機能とその創薬・治療への応用、第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬・治療のターゲットとしての細胞分化」(オーガナイザー) (2016, 3, 横浜)
- [4] 清水英雄、小針彩奈、須知由未子、花村健次、白尾智明、田辺光男、関野祐子、佐藤 薫: シナプスイメージングに基づく中枢神経系有害反応の *in vitro* 評価のための新規パラメータ確立の試み、第 89 回日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [5] 重本—最上由香里、干川和枝、関野祐子、佐藤 薫: 活性化型ミクログリアが引き起こす血液脳関門のバリア崩壊過程におけるサイトカイン・ケモカイン動態の解析、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [6] 高橋華奈子、笠原のぞみ、小原悠、高瀬将弘、中條かおり、関野祐子、田辺光男、佐藤 薫: Neurosphere 維持期間が神経分化に及ぼす影響、第 89 回 日本薬理学会年会 (2016, 3, 横浜)
- [7] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Shimizu, H., Chujo, K., Hoshikawa, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y., Sato, K.: Comparison of the NMDA receptor expression and the extent of excitotoxicity in human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons. CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
- [8] Shigemoto-Mogami, Y., Sato, K., Hoshikawa, K., Kikura-Hanajiri, R., Hakamatsuka, T., Sekino, Y.: Evaluation of drug-induced CB2 cannabinoid receptor activity in the CNS using the ERK1/2 phosphorylation pathway of microglial cells, CBI 学会 2015 年大会 (2015, 10, 東京)
- [9] 佐藤 薫, 清水英雄, 小針彩奈, 花村健次, 白尾智明, 田辺光男, 関野祐子: 神経細胞の微細構造イメージングに基づく中枢神経系有害反応 *in vitro* 評価系の開発. 第 24 回日本バイオイメーjing学会学術集会 (2015, 9, 東京)
- [10] 佐藤 薫.: 非臨床薬理試験においてヒト iPS 細胞由来神経細胞を活用するために必要なこと. 千里ライフサイエンスセミナー J3 (講演), (2015, 9, 大阪)
- [11] Hoshikawa, K., Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K.: Study about the mechanisms of DHA-induced enhancement of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
- [12] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia regulate the cytokine/chemokine dynamics in the brain and enhance

- the functional maturation of blood-brain barrier. 第 58 回日本神経化学学会大会 (2015, 9, さいたま市)
- [13] Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y., Sato, K. Study about the mechanisms for the regulation of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 function by docosahexanoic acid. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
- [14] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K.: Microglia affect blood-brain barrier function via cytokines and chemokines release. 第 38 回日本神経科学大会 (2015, 7, 神戸市)
- [15] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia affect functional maturation and inflammation-induced breakdown of the blood brain barrier by modulating the dynamics of cytokines and chemokines. Society for Neuroscience 2015 (2015, 10, Chicago, USA)
- [16] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia have roles in both of maturation and break down of the barrier function of blood brain barrier. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (2015, 7, Bilbao, Spain)
- [17] 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)
- [18] 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)
- [19] 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)
- [20] 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化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)
- [21] 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)
- [22] 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)
- [23] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T. and 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)
- [24] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, Y., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T. and 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, 大阪)
- [25] 佐藤 薫：安全性薬理試験へのヒト iPS 細胞由来神経細胞の応用—神経特異的影響評価の可能性と課題、第 11 回 医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラムヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現にむけて (2014, 12, 東京)
- [26] 佐藤 薫：hiPSC 由来神経細胞に期待すること—医薬品開発における実用のために、CBI 学会 2014 年大会 Focused session 「In vitro 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞間の「シナプス形成不全」解決にむけて— Human neuronal circuitry on dish は

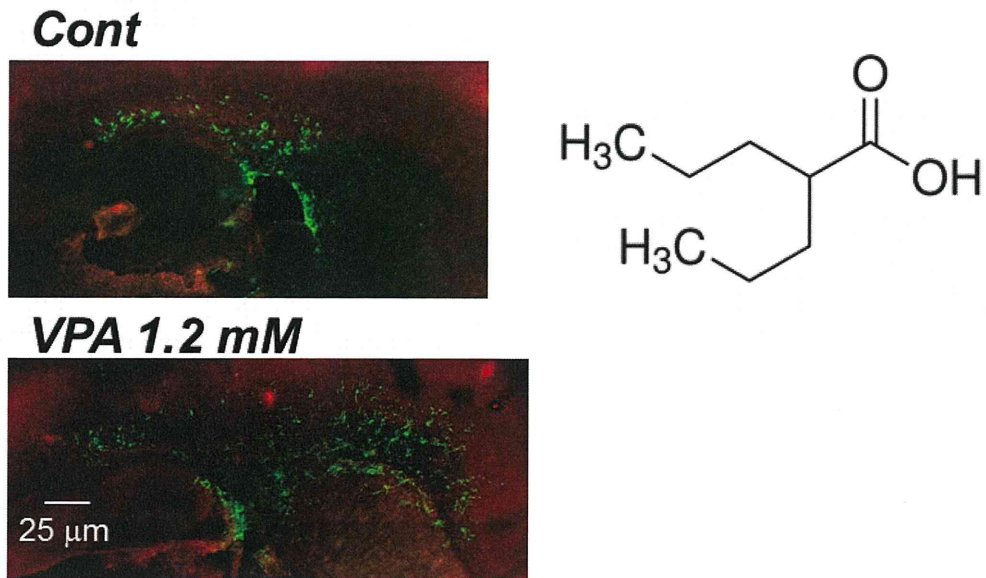
- 実現できるのか」(オーガナイザー)  
(2014, 10, 東京)
- [27] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato, K.: Establishment of neuron-specific toxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, CBI 学会 2014 年大会 (2014, 10, 東京)
- [28] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E. and Sekino, Y.: Discovery of the population of activated microglia which enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [29] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato, K.: Application of human induced pluripotent stem cell-derived neurons to the neurotoxicity evaluation system, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [30] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y. and Sato, K.: Development of in vitro blood-brain barrier model including microglia, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [31] Kasahara, Y., Fujimori, K., Miura, M., Mogami, Y., Sekino, Y., Sato, K. and Suzuki, T.: Comparison of the effects of antidepressants on the microglial activation in LPS-inflammation model, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [32] Roppongi, R.T., Ohara, Y., Koganezawa, N., Yamazaki, H., Otsu, M., Sato, K., Sekino, Y. and Shirao, T.: Slow axonal growth in human iPSCs-derived neurons, Neuroscience2014 (2014, 9, 横浜)
- [33] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H. and 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)
- [34] Otsu, M., Yamazaki, H., Roppongi, R.I., Koganezawa, N., Ohara, Y., Sato, K., Sekino, Y. and 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)
- [35] 佐藤 薫: ヒト iPSC 細胞由来神経細胞は神経特異的有害反応を予測できるか、第 41 回 日本毒性学会学術年会シンポジウム (2014, 7, 神戸)
- [36] 佐藤 薫: ヒト iPSC 細胞由来神経細胞によるヒト神経有害反応予測系の構築、PMDA 講演 (2014, 4, 東京)
- [37] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K. and Sekino, Y.: Microglia accelerates the maturation of barrier function of blood brain barrier. SfN2014 (2014, 11, Washington D.C., USA)
- [38] Koganezawa, K., Ohara, Y., Yamazaki, H., Roppongi, R.I., Sato, K., Sekino, Y. and Shirao, T.: Axonal polarity formation in human iPSCs-derived neurons. SfN2014 (2014, 11, Washington D.C., USA)
- [39] Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T., Sekino, Y. and 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)
- [40] Sekino, Y., Otsu, M., Ohara, Y., Yamazaki, H., Sato, K., Roppongi, R., Koganezawa, N. and 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)
- [41] Sato, K.: Microglia enhances

- neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. Dept Cell Biol Anat Seminar, New York medical college (2014, 10, Varhara, USA)
- [42] Sato, K.: Sequential expression of various receptors along with the differentiation of human iPSC-derived neurons. ISN satellite symposium (2014, 9, Tokyo, Japan)
- [43] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E. and 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)
- [44] 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, 熊本市)
- [45] 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 iPSC 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, 熊本市)
- [46] 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, 熊本市)
- [47] 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, 熊本市)
- [48] 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, 熊本市)
- [49] 佐藤 薫：ミクログリアの病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, 仙台市)
- [50] 大原由貴、山崎博幸、大津真生、佐藤 薫、関野祐子、白尾智明：ヒト iPSC 細胞由来神経細胞の発達に関する研究、第 91 回 日本生理学会大会 (2014, 3, 鹿児島市)
- [51] 佐藤 薫：ヒト iPSC 細胞由来神経細胞に期待すること、4 社共催：ヒト iPSC 細胞由来神経ワークショップ (講演) (2014, 3, 横浜市)
- [52] 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 iPSC 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)
- [53] Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato, K.: An attempt to establish the neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 7<sup>th</sup> Takeda science foundation symposium on pharmasciences 'iPS Cells in drug discovery and development' (2014, 1, 大阪市)
- [54] 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 iPSC 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キング学会 (2013, 9, 東京)
- [55] Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J., Suzuki, T. and 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, 9, 京都)
- [56] Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Miura, M., Sekino, Y. and Sato, K.: Development of *in vitro* blood-brain barrier model reflecting the function of neurovascular unit, Neuro2013 (2013, 9, 京都)
- [57] Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y. and Sato, K.: The function of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 is enhanced by docosahexanoic acid, Neuro2013 (2013, 9, 京都)

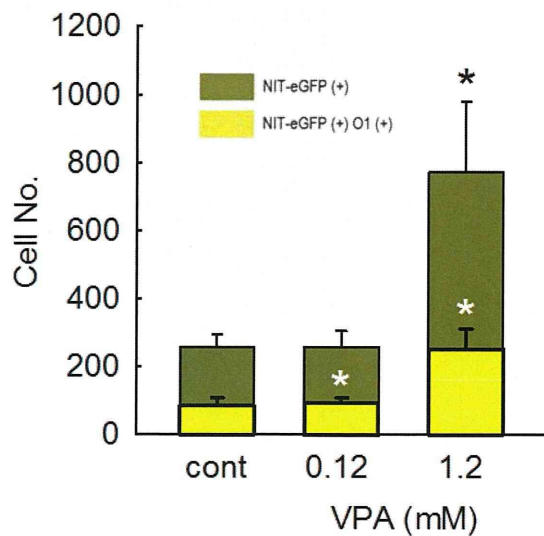
- [58] Ohtsu, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Okada, Y., Okano H., Sato, K. and Sekino, Y.: An Attempt to develop a neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons vulnerable to excitotoxicity, Neuro2013 (2013, 9, 京都)
- [59] Hoshikawa, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K.: Activated microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis via inflammatory cytokines, Neuro2013 (2013, 9, 京都)
- [60] 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, 9, 京都)
- [61] 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, 秋田市)
- [62] Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Goldman, J.E., Sekino, Y.: The role of microglia in neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. SfN2013 (2013, 11, San Diego, USA)
- [63] Ohara, Y., Yamazaki, H., Sato, K., Shirao, T., Sekino, Y.: Morphological development and expression of synaptic proteins of human iPSC-derived neurons. (2013, 11, San Diego, USA)
- [64] 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)
- [65] 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)
- [66] Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and Sato, K.: Calcium signalling of human iPS-derived neurons responding to ATP and L-glutamate stimulation. ISN-ASN 2013 (2013, 4, Cancun, Mexico)
- [67] Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and 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)



A



B



C

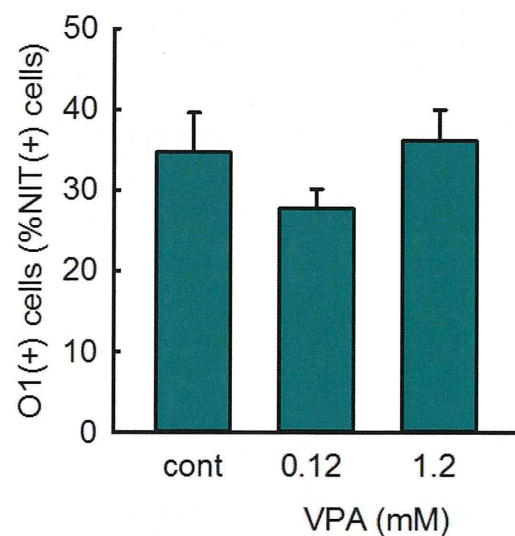


図 1. 前脳矢状面切片培養系における神経系細胞新生およびオリゴデンドロサイト新生に対する VPA の影響

SVZ 中、ピンポイントに eGFP 標識された新生細胞群 (神経幹細胞および前駆細胞) を含む培養前脳矢状面切片を VPA (120  $\mu$ M, 1.2 mM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は 1.2 mM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数は VPA によって濃度依存的に増加した (黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も VPA によって濃度依存的に増加した (図 1B、黄色カラム)。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は VPA によって影響を受けていなかった。\*:  $p < 0.05$ , Tukey's test following ANOVA,  $N=4$ 。



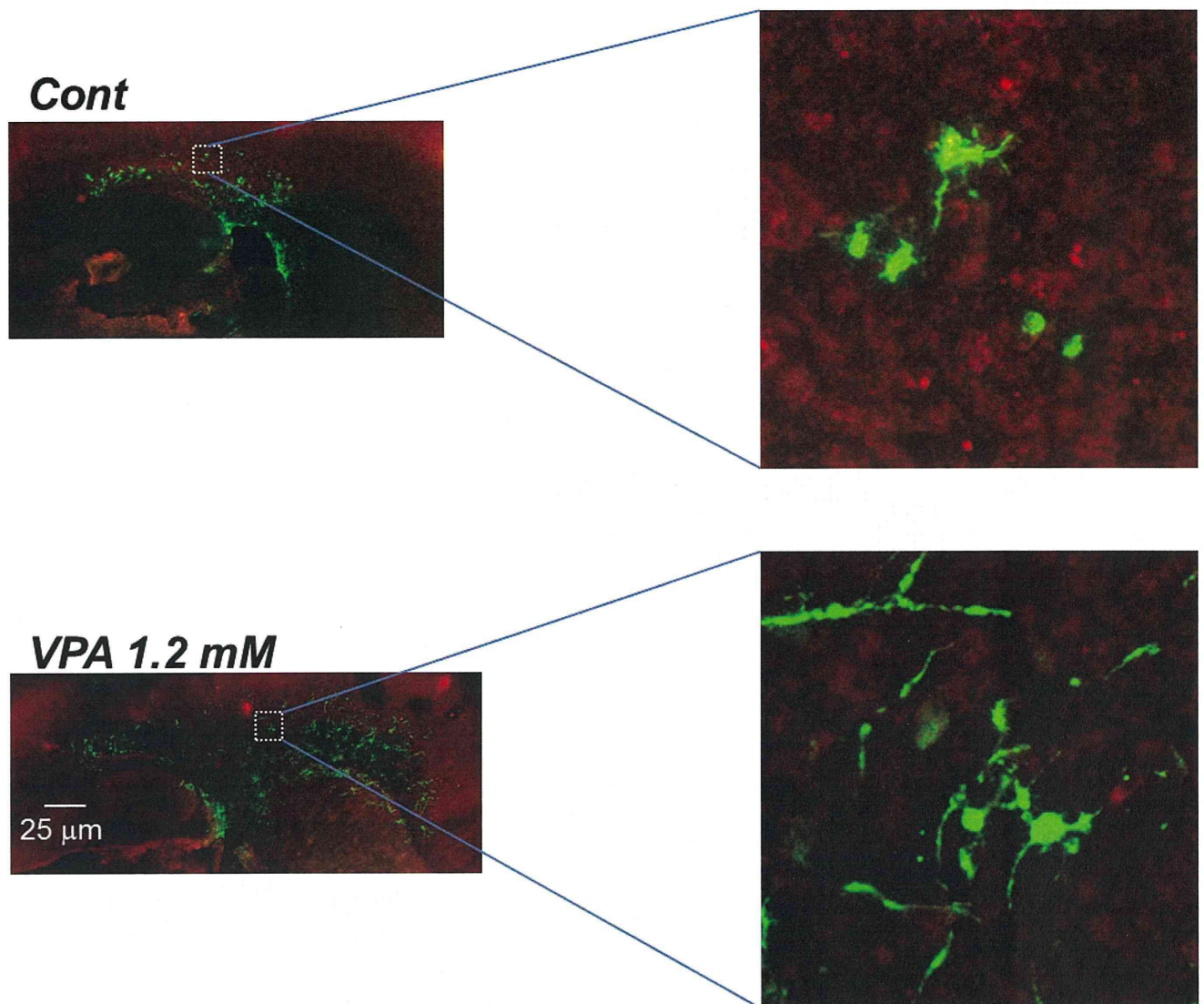
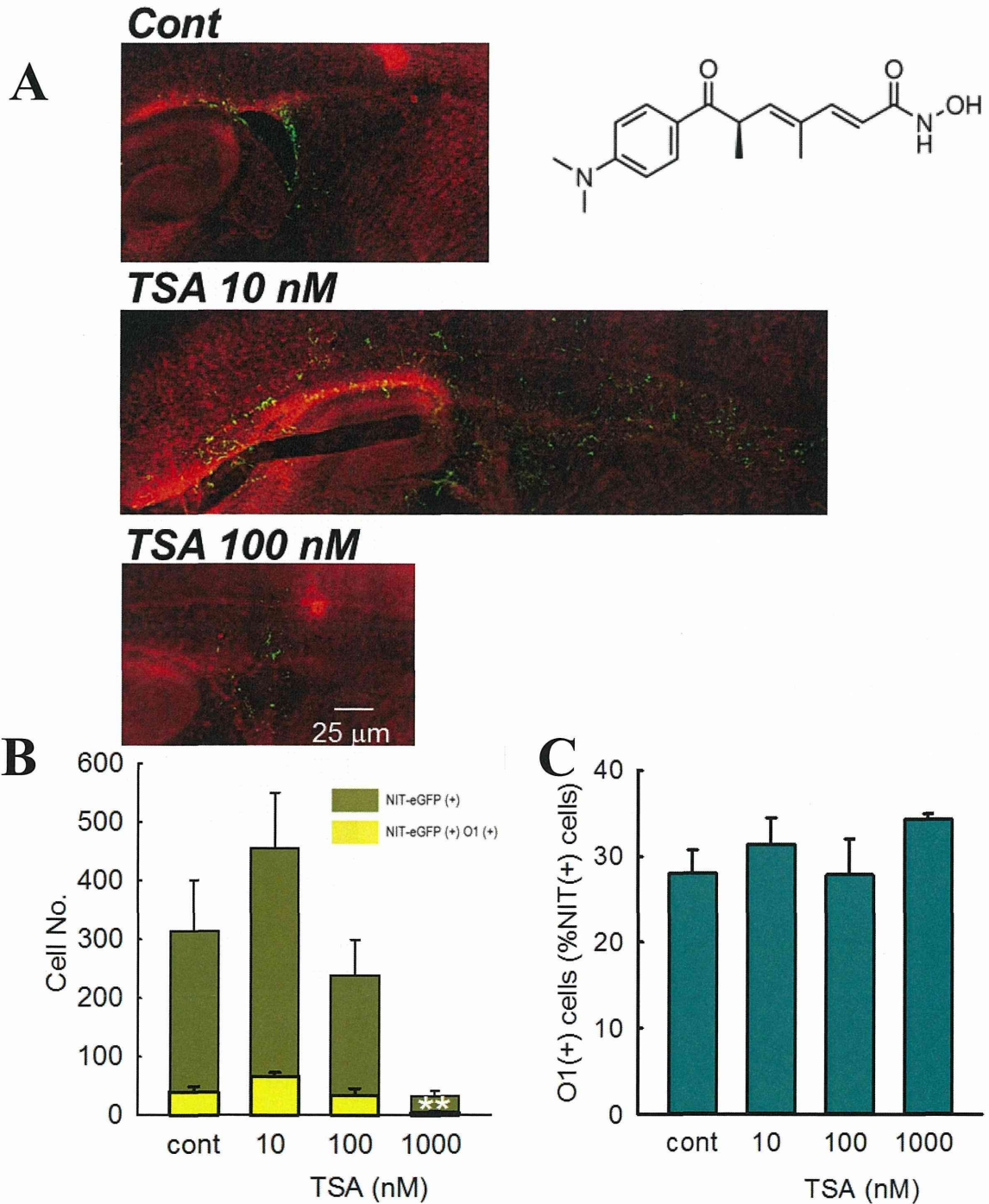


図 2. 遊走中細胞の形態に対する VPA の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、VPA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。



3. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する TSA の影響  
 eGFP 標識された新生細胞群（神経幹細胞および前駆細胞）を含む培養前脳矢状面切片を VPA (10 nM-1  $\mu$ M) 処理した（3 日間）。A: eGFP(+) 新生細胞（緑色）O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞（赤）。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は TSA 10 nM では増加傾向にあり、1 mM では減少傾向にあった。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数（黄土色カラム）および eGFP(+)O1(+) 細胞数（黄色カラム）。10 nM で eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数を増加させる傾向が見られた。100 nM 以上の濃度では、逆に減少させる傾向が見られた。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は TSA によって影響を受けていなかった。  
 \*\*:  $p < 0.01$ , Tukey's test following ANOVA,  $N = 4$ .



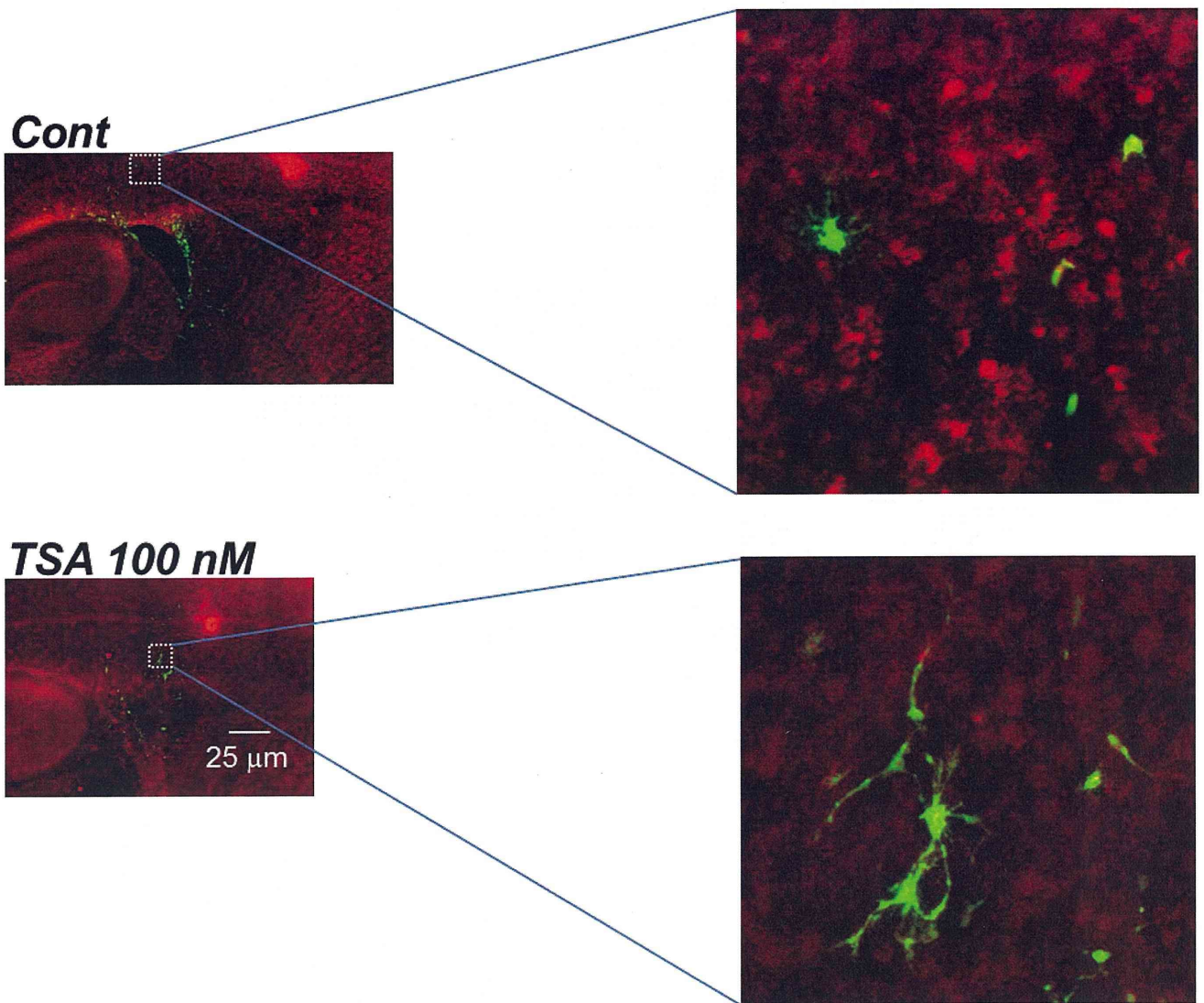


図 4. 遊走中細胞の形態に対する TSA の影響

コントロール群では、遊走中の細胞の突起は短く、円形に近いものも多数見受けられるが、TSA 処理群では、観察したほぼ全ての細胞で突起伸張が促進されていた。

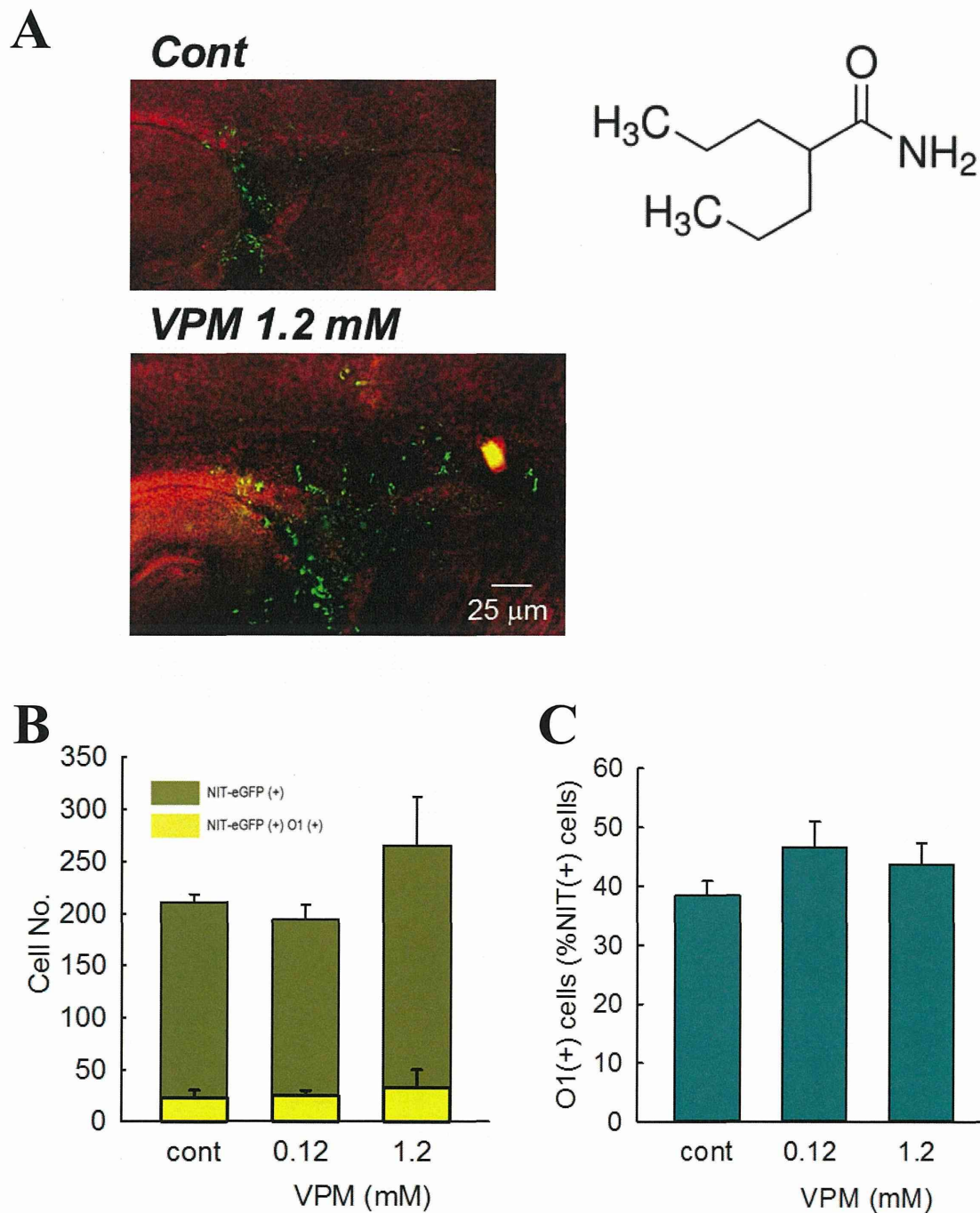


図 5. 前脳矢状面切片培養系におけるオリゴデンドロサイト新生に対する VPM の影響  
 GFP 標識された新生細胞群 (神経幹細胞および前駆細胞) を含む培養前脳矢状面切片を VPM (120 μM, 1.2 mM) 処理した (3 日間)。A: eGFP(+) 新生細胞 (緑色) O1(+) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (赤)。eGFP(+) 細胞、eGFP(+)O1(+) 細胞の遊走範囲は VPA によってほとんど変化しなかったが、1.2 mM において増加傾向が見られた。B: 培養切片中 eGFP(+) 細胞数および eGFP(+)O1(+) 細胞数。eGFP(+) 細胞数は VPM によってほとんど影響を受けなかった。(黄土色カラム)。eGFP(+)O1(+) 細胞数も ほとんど影響を受けなかった(黄色カラム)。C: eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合。eGFP(+) 細胞中の eGFP(+)O1(+) 細胞の割合は VPM によって影響を受けていなかった。\*:  $p < 0.05$ , Tukey's test following ANOVA,  $N=4$ .