

神経細胞、ミクログリアの細胞老化指標の明確化を目指した検討

研究分担者 最上 由香里 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部
実験担当者 高橋 華奈子, 最上 由香里

研究要旨

近年、加齢に伴って生じる脳細胞の体細胞変異やエピジェネティクス異常が、環境要因によって増悪するという新たな健康被害が懸念されている。このような毒性を評価するためには、細胞老化との関連性を考慮した*in vitro*でのゲノム毒性評価法の開発が重要である。環境要因に起因する健康リスクを評価するためには、生体の加齢に伴う細胞老化とゲノムへの影響を評価する必要があるが、生体の細胞老化を評価出来る明確な指標は整備されておらず、困難となっている。そこで本研究では、正常老齢マウスおよび若齢マウスより脳細胞を単離し、ゲノム毒性評価を実施する。細胞老化モデル細胞として、由来や寿命が異なる神経細胞とミクログリアを選定し、それぞれの細胞老化とゲノム毒性を検証する。さらに、加齢に伴う神経細胞、ミクログリアの細胞性状変化を生体レベル、細胞レベルで多角的に検証し、細胞老化の指標を抽出することを目指す。

本年度は、①若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(C57BL/6J 24ヶ月齢, ♂)由来の神経細胞とミクログリアのゲノム毒性チームへの供給、②*in vivo* / *in vitro*での神経細胞/ミクログリアの細胞性状検討と細胞老化の指標の整備、を実施した。具体的には、昨年度確立した細胞採材プロトコルを用いて、若齢および老齢マウスの前脳より神経細胞とミクログリアを単離回収し、ゲノム毒性評価、シングルセルトランスクリプトーム解析、および長期細胞培養条件の整備等、各種実験を実施するための細胞供給体制を整備した。細胞性状の検出方法としては、培養下での細胞形態、細胞機能検討(*in vitro*)、脳凍結切片における細胞形態、細胞老化マーカー発現検討(*in vivo*)、シングルセルトランスクリプトーム解析(*in vivo*)を実施した。マウスの脳海馬領域の神経細胞とミクログリアの免疫染色解析の結果、今回用いた老齢マウス神経細胞/ミクログリアが確かに細胞老化状態であること、神経細胞とミクログリアに細胞老化進行度の差がある可能性が示唆された。今後、シングルセルトランスクリプトーム解析により、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。得られた結果に基づき、生体の細胞老化指標を抽出、整備することを目指す。本研究は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

A. 研究目的

近年、加齢に伴って生じる脳細胞の体細胞変異やエピジェネティクス異常が、環境要因によって増悪するという新たな健康被害が懸念されている。このような毒性を評価するためには、細胞老化との関連性を踏まえた*in vitro*ゲノム毒性評価法の開発が重要である。加えて、化学物質に起因する健康リスクの蓋然性を評価するためには、生体の加齢に伴う細胞老化とゲノムへの影響を正しく評価する必要がある。しかしながら、現状、生体の加齢に伴う細胞老化を評価出来る明確な指標が整備されておらず、困難となっている。そこで本研究では、正常老齢マウスおよび若齢マウスより脳細胞を単離し、ゲノム毒性評価を実施する。細胞老化モデル細胞として、由来や寿命が異なる神経細胞とミクログリアを選定し、それぞれの細胞老化とゲノム毒性を検証する。さらに、加齢に伴う神経細胞、ミクログリアの細胞性状変化を生体レベル、細胞レベルで多角的に検証し、細胞老化の指標を整備することを目指す。

本年度は、昨年度確立した細胞採材プロトコルを用いて、若齢、老齢マウス(C57BL/6J, ♂)より神経細胞、ミクログリアを単離回収し、

- ① ゲノム毒性評価(ゲノム毒性評価チームへの供給)
- ② シングルセルトランスクリプトーム解析(受託解析)

- ③ 長期細胞培養条件の整備

- ④ マウスの脳凍結切片の免疫染色

上記の実験を実施した(図1)。若齢、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアを用い、ゲノム毒性評価(①)、単一細胞レベルの細胞性状解析(②)、生体における形態学的変化と細胞老化マーカーの発現解析(④)より、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。細胞老化指標を整備するための基盤データを取得し、個体の老化に伴う細胞老化と、ゲノム毒性の関連性を評価する。本研究は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

B. 研究方法

試薬

以下の試薬を購入し、実験に用いた。

Adult Brain Dissociation kit(130-107-677)、C-Tube(130-093-237)、Adult Neuron Isolation Kit(130-126-602)、Microglia Micro Beads(130-093-636)、はMiltenyi Biotec社より入手した。Anti-LaminB1(ab16048)、Anti-p21(ab188224)、Anti-MAP2(ab5392)は、Abcam社より入手した。Anti-Iba1(GTX100042)、Anti-CD68(GTX41865)はCeneTex社より入手した。DAPI(342-07431)、PI(343-07461)はDojindo社より入手し

た。VECTASHIELD(H-1000)はVector Laboratories社より入手した。Alexa Fluor goat anti-rabbit IgG (A11034)、Alexa Fluor goat anti-mouse IgG (A11029)はInvitrogen社より入手した。10X G-Activate pH9(ARSE9-01)はGenoStaff社より入手した。Anti-Iba1 (090-19741)はWako社より入手した。Poly-L-Lysine(P9155)はSigma-Aldrich社より入手した。牛胎児血清(26140-079)、ペニシリン-ストレプトマイシン(15140-122)、DMEM(11965-0921)、F12(11765-054)はGibco社より入手した。BDNF(450-02)、MCSF(315-02)、TGF β (100-21)はPepro tech社より入手した。Hoechst(346-07951)はDojindo社より、8 well chambered coverslip(80826)はibidi社より入手した。Senescence β -Galactosidase Staining Kit (#9860)は、Cell Signaling Technology社より入手した。GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781)は、10X GENOMICS社より入手した。OCT-compounds(4583)は、サクラファインテックジャパン社より入手した。

実験動物

若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(C57BL/6J 24ヶ月齢, ♂)は東京都健康長寿医療センター研究所より入手した。

脳組織分散と細胞単離

マウスを深麻酔下で心灌流により脱血し、迅速に脳を摘出した後、顕微鏡下で前脳領域を採取した。

脳サンプルの細胞分散はAdult Brain Dissociation kitのManualに従い、Gentle MACS Dissociator(Miltenyi Biotec社)を用いて分散した。下記に簡単に方法を記す。

脳サンプルの重量を計測し、分散バッファの入ったホモジネーターチューブ(C-Tube)に浸した後、チューブ内で5mm角にカットした。脳サンプルをGentle MACS Dissociatorを用いて単一細胞に分散し、デブリ除去を行った。精製した脳単一細胞は、細胞特異的磁気ビーズ抗体を用いたMACS法により神経細胞(Adult Neuron Isolation Kit)とミクログリア(Microglia Micro Beads)に単離した。

細胞ポピュレーション解析

単離した神経細胞、ミクログリアの純度、細胞数、生細胞の割合をMACS Quant Analyser10(Miltenyi Biotec社)を用いて解析した。神経細胞は、Anti-Biotin APC、Anti-NeuN-AF488、Viability Fixable Dye 405/452を用い、Transcription Factor Staining Buffer setを用いて、細胞外、細胞核をラベルした。ミクログリアは、CD45-FITC、CD11b-PE、TMEM119-Coralite647、Viability Fixable Dye 405/452を用い、Inside Stain kitを用いて細胞外、細胞内をラベルした。

ミクログリア培養

神経細胞陰性分画を、Poly-L-Lysine(10 μ g/mL、3時間、室温; P9155、Sigma-Aldrich)でコートしたT25フラスコに播種した。培地は、10%牛胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(15140-122、Gibco)を含むDMEM/F12(11965-092、Gibco; 11765-054、Gibco)を基礎培地とし、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF、10 ng/mL、315-02、PeproTech)およびトランスフォーミング増殖因子 β 1(TGF- β 1、50 ng/mL、100-21、PeproTech)を添加した。培地は2~3日に1回交換し、3~4週間培養後、フラスコを振幅約20cmで毎分60回程の早さで1-2分間振盪し、回収した培地中の細胞をPoly-L-Lysineコート 8 well chambered coverslip(80826、ibidi)に播種した。

免疫細胞染色

8 wellチャンバーに播種後、ミクログリア用培養プロトコル用いて1日間培養した細胞標本を、ミクログリアマーカーIba1(1:500、090-19741、Wako)及びHoechstの2重

染色を行った。免疫染色後の標本は、共焦点レーザー顕微鏡システムA1R(Nikon)を用いて撮影を行った。

免疫組織染色

マウスを深麻酔下で心灌流し脱血した後、4% PFAにより灌流固定を行った。脳を摘出し、4% PFA中で一晩固定した後30% sucrose 溶液で置換し、OCT-compoundsに包埋した。クライオスタット(CM3050、Leica)を用いて、30 μ m スライス切片を作成しスライドに接着させ、スライス標本作製した。スライス標本は、必要に応じ、熱賦活化抗原開示処理を行った。その後、0.3% TritonX、3% Goat Serum-PBS中にて室温3時間インキュベーションし、一次抗体(Anti-MAP2, 1:100, Anti-Iba1, 1:500, Anti-CD68, 1:100, Anti-LaminB1, 1:10000, Anti-p21, 1:1000)にて4°C 16時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体(Anti-rabbit or mouse IgG, 1:1000)にて室温2時間インキュベーションした後、洗浄後DAPI(1:1000)でカウンターステインした。洗浄した後、切片を乾燥させ、蛍光退色保護剤を滴下し、カバーガラス内に封入した。LaminB1、p21は、Tris-EDTAバッファ(pH 9.0)を用いた熱媒介抗原回収を実施した。

染色画像は共焦点レーザー顕微鏡システムA1R(Nikon)を用いて撮像し、NIS-Elementを用いて解析を行った。

β -Galactosidase(SA- β -Gal)染色

SA- β -Gal 染色は、Senescence β -Galactosidase Staining Kit(Cell Signaling Technology)を用いて実施した。厚さ30 μ mの凍結脳薄切標本に β -Galactosidase Staining溶液を滴下し、37°Cで24時間インキュベーションした。その後、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X710(KEYENCE)を用いて撮影を行った。

シングルセルトランスクリプトーム解析(Flexサンプル作成)

若齢、老齢マウス由来神経細胞および若齢、老齢マウス由来ミクログリアは、各群9匹のマウスより採材し、プールした。単離した神経細胞およびミクログリア細胞はGEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781、10X GENOMICS)を用いて固定化した。固定化細胞はPIを用いてセルカウントした後、Stock溶液中に細胞を分散し、-80°Cにて凍結保存した。作成したFlexサンプルは、タカラバイオ遺伝子解析センターに送付し、Chromium GEM-X Fixed RNA ライブラリー作成、NovaSeqシーケンシング、Cell Rangerを用いたシングルセル発現解析を実施した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認(承認番号1012)を得て、規定に則り、適切に実施した。

C. 研究結果

図1に、若齢マウス(C57BL/6J 3ヶ月齢, ♂)、老齢マウス(C57BL/6J 24ヶ月齢, ♂)由来神経細胞、ミクログリアの細胞採材、ポピュレーション解析、各種実験の流れを示す。脱血後脳サンプルは、氷冷下において前脳領域を摘出し、秤量した。細胞採材に用いたマウスの体重は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは37.4%増大しているのに対し、前脳領域の重量は、ほとんど変化していないことが示された。

前年度確立した細胞分散単離プロトコルに基づいて、マウス前脳より脳細胞分散液を精製し、神経細胞、ミクログリアに単離した。単離した神経細胞、ミクログリアの細胞数、純度をMACSQuant Analyzer10で検証した代表

的な結果を下記に示す。神経細胞では、若齢マウス；細胞数 1.23×10^5 、純度96.48%、老齢マウス；細胞数 5.84×10^4 、純度96.58%であることが明らかになった。またそのうち成熟神経細胞のマーカーとして知られるNeuN陽性細胞は、若齢マウス；純度87.47%、老齢マウス；純度84.23%であることが示された。一方、ミクログリアでは、若齢マウス；細胞数 1.83×10^5 、純度92.23%、老齢マウス；細胞数 1.56×10^5 、純度92.48%であることが明らかになった。またそのうちミクログリア特異的マーカーとして知られるTMEM119陽性細胞は、若齢マウス；純度70.99%、老齢マウス；純度74.91%であることが示された。また、いずれの細胞も生存率は95%以上であった。上記の結果は若齢マウス(n=3)、老齢マウス(n=3)で検証し、再現性を確認している。

図1に示すように、回収細胞は、①ゲノム毒性評価サンプル、②シングルセルトランスクリプトーム解析、③細胞培養に使用した。加えて、④免疫組織染色を行った。

① ゲノム毒性評価

単離した細胞を用いて、体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性評価を開始した(ゲノム安全科学部)。若齢マウスおよび老齢マウス1個体から神経細胞、ミクログリアをそれぞれ単離した。若齢マウスから、神経細胞8例、ミクログリア5例を、老齢マウスから神経細胞8例、ミクログリア5例を細胞懸濁液として、ゲノム毒性評価チームへ供給した。

② シングルセルトランスクリプトーム解析

単離した細胞のシングルセルレベルでの細胞性状を解析するため、シングルセルトランスクリプトーム解析を実施した。若齢マウス、老齢マウスより、神経細胞、ミクログリアを単離した。GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kitを用いて、4°Cで23時間固定した。固定した神経細胞、ミクログリアはPI染色して細胞核数をカウントした後、-80°C保存した。細胞単離は複数回に分けて実施し、固定化凍結サンプルをプールした。PIカウント数として、神経細胞(若齢マウス9個体より; 1.51×10^6 細胞、老齢マウス9個体より; 1.22×10^6 細胞)、ミクログリア(若齢マウス9個体より; 3.57×10^6 細胞、老齢マウス9個体より; 3.80×10^6 細胞)を回収することができた。GEM-X Flexシングルセルゲノム解析はタカラバイオ株式会社遺伝子解析センターに委託した。図2に示すように、神経細胞(若齢)、神経細胞(老齢)、ミクログリア(若齢)、ミクログリア(老齢)の4つのデータセットを得た。今後、神経細胞の若齢・老齢比較、ミクログリアの若齢・老齢比較の高次解析を実施し、細胞種アノテーション、遺伝子発現変動解析に基づき、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する予定である。

③ 細胞培養

若齢および老齢マウス由来のミクログリア細胞を用いた*in vitro*評価系の構築を目的として、ゲノム解析に使用しない神経細胞陰性画分の細胞を用いて、ミクログリア細胞の長期培養および細胞数増幅プロトコルの整備を試みた。4週間の長期培養後、振盪操作により回収した培地中の細胞を免疫染色した結果、若齢マウスでは 1.47×10^5 細胞、老齢マウスでは 5.2×10^4 細胞のIba1陽性ミクログリアが確認出来た。

④ 免疫組織染色

生体レベルでの神経細胞とミクログリアの加齢に伴う

細胞性状変化と細胞老化を評価し、老化指標を明確化するため、免疫組織染色を行った。若齢マウス5例、老齢マウス4例の脳固定サンプルよりスライス切片を作成し、神経細胞、ミクログリアの選択的マーカー抗体および細胞老化マーカー抗体を用いて染色を行った。代表的な染色像を図3に示す。神経細胞はMAP2(A)、ミクログリアはIba1(B)、CD68(B c)でそれぞれ染色した海馬領域を示している。MAP2は微小管を調節するチューブリンタンパク質であり、神経細胞の細胞体、樹状突起に発現する。図Aで示すように、若齢マウスの海馬CA1、DG領域では、神経細胞の構造が明確に観察できている。一方、老齢マウスでは、MAP2シグナルが弱くなり、突起構造も不連続になっている。Iba1は単球やマクロファージで発現する Ca^{2+} 結合タンパク質であり、ミクログリアのマーカーとして用いられる。Bは海馬CA1領域の染色像を示しているが、若齢マウスと比較して、老齢マウスではIba1陽性ミクログリアの細胞数が増大し、形態も突起が短く細胞体が大い活性型へと変化している。B cではCD68の染色像を示す。CD68は主にリソソーム、エンドソームに局在し、貪食活性化したミクログリアのマーカーとして用いられる。矢頭で示すように、老齢マウスのCA1領域では、CD68+Iba1+ミクログリアが複数観察でき、貪食活性の亢進したミクログリアが多数存在していることが示された。C aには、海馬CA1領域Iba1陽性ミクログリア細胞体で観察される、CD68シグナルを示している(黄色矢頭)。若齢マウスと比較して、老齢マウスでは、大きく、高いシグナル強度を示す、複数のCD68シグナルが示されている。C bには、CD68シグナルの定量解析結果を示している。老齢マウスではIba1陽性ミクログリアに局在するObject数(C b左)、総シグナル強度(C b右)が有意に増加しており、貪食活性が亢進している事が示されている。

さらに、2024年に細胞老化実験ガイドライン(Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150-4175.)で提唱された細胞老化マーカーについても検討した(図4)。Lipofuscinは酸化したタンパク質や脂質により構成された凝集体であり、加齢とともにリソソーム内に蓄積する不溶性の色素である(A a)。自家蛍光を発することから、aで示すように、ピンク色のシグナルとして観察できる。老齢マウスでは海馬神経細胞層に沿って、若齢マウスでは観察できないドット状のLipofuscinのシグナルが観察できることが示された。右図はCA1領域の拡大図を示しているが、老齢マウスで観察される細胞核周辺のドット状のLipofuscinシグナルが、若齢マウスではほとんど確認できない。A bでは核膜の裏打ち網目状構造ラミナの主要成分であるLaminB1の染色像を示している。LaminB1は高密度な繊維状構造を構成するタンパク質であるが、細胞老化とともにその発現が低下することが報告されている。bで示すように、若齢、老齢マウス双方において染色像が確認できたが、老齢マウスではLaminB1発現が低下している細胞核が多いことが示された。A cではサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であるp21の染色像を示している。矢頭で示すように老齢マウスでは、p21のシグナルが強く、発現細胞数が増大していることが示された。dでは β -gal染色像を示す。矢頭で示すように、老齢動物では青色のシグナルを有する、 β -gal陽性細胞が観察出来た。また、上記の老化マーカーについて、神経細胞、ミクログリアのマーカーと共染色し、細胞種ごと、領域ごとの発現と局在の定量解析を進めている。Bでは、p21の定量解析結果を示している。B aは、若齢、老齢マウスの海馬領域CA1領域のp21、Iba1、Lipofuscin、DAPIの染色画像であり、インセットに代表的なミクログリア、神経細胞のp21シグナル像を示して

いる。細胞核でROIをとり細胞核内部のp21シグナルを定量化した(核内のp21ドット数、核内のp21面積%、核内のp21平均シグナル強度、B b)。神経細胞、ミクログリア共に、老齢動物において、核内のp21シグナルが急激に増大していた。老齢動物のp21シグナルを神経細胞、ミクログリア間で比較した結果、核内のp21ドット数は神経細胞が多い一方で、核内のp21面積と平均シグナル強度はミクログリアが高い数値を示した。すなわち、ミクログリア核内部のp21シグナル陽性領域は、蛍光強度が高く、大きい。一方、神経細胞核内部のp21シグナル陽性領域は蛍光強度が低く、小さな領域が多数存在していることが示された。この結果は神経細胞とミクログリアの細胞種間における老化進行度と細胞分裂能の違い等を考察する上で重要な情報であり、さらなる検証が必要である。

以上のデータから、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアが細胞老化フェノタイプを獲得していることが明らかになった。また、神経細胞とミクログリア間で細胞老化の進行度に差がある可能性も示された。2024年に細胞老化実験ガイドラインで提唱された細胞老化マーカーは*in vitro*実験データを根拠にするものも多いが、我々のデータはこれらが*in vivo*実験においても有効である事を示す実証データでもある。

D. 考察

免疫組織化学的検討から、老齢動物の海馬領域において神経細胞およびミクログリアの形態学的変化が観察された。さらに、2024年に細胞老化実験ガイドライン(Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150)で提唱された細胞老化マーカーについても検討し、Lipofuscin が老齢マウス海馬神経細胞に顕著に蓄積していることを確認した。ミクログリアにおいても Lipofuscin 陽性細胞は見られたが、神経細胞に比べて細胞数、蓄積量共に少なかった。また、神経細胞、ミクログリアにおける p21 の核内蓄積を評価した結果、老齢マウスの神経細胞、ミクログリアにおいて、顕著に p21 シグナルが増大していること、また、神経細胞と比較してミクログリアの p21 シグナル数値と核内面積が高いことが示された。p21 はその発現量に応じて、細胞周期、細胞老化を制御すること(Hsu et al., Cell 2019 178 361)、免疫応答性の遺伝子誘導を引き起こすこと(Sturmlechner et al., Science 2021 374 577)が報告されている。本研究で示された老齢マウスにおけるミクログリアと神経細胞の p21 シグナルの相違は、異なる細胞種間の分裂能の相違に由来する細胞老化度の違いのみならず、免疫応答性シグナルの違いを反映している可能性がある。今後、LaminB1、PLIN2、4-Hydroxynonenal、 β -gal などのその他の老化指標についても検討し、考察を深める必要がある。さらに、モデル細胞として単離回収した神経細胞、ミクログリアのシングルセルトランスクリプトームの解析を進めている。高次解析、細胞アノテーション解析、発現変動解析を実施し、単一細胞レベルの加齢に伴うエピジェネティクスな細胞性状変化と細胞老化の関連性を評価する。さらに、加齢に伴って細胞性状が大きく変化する細胞集団を特定すると同時に、細胞老化指標を抽出し、

整備する。これらの検討により、老化にともない変動する細胞集団やそのエピジェネティクスな変化が明確化することが期待できる。また、採材した細胞から、より多くの指標を得るため、長期細胞培養の整備も進めている。上記の検討は、体細胞ゲノム毒性評価系構築のための基盤となることが期待される。

E. 結論

今年度は、ゲノム毒性評価のための細胞供給体制を整備することができた。さらに、シングルセルトランスクリプトーム解析や免疫組織学解析により、加齢に伴い細胞性状が変動する細胞集団の特定や、細胞老化指標の明確化を進めている。本研究で得られる知見は、環境要因によって悪化する健康リスクの理解を深め、ゲノム毒性評価系を構築するための基盤となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. ACS Omega 2026, 11, 13, 20547-20558, doi:10.1021/acsomega.5c12080
2. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K, Search for marker proteins to assess blood-brain barrier development, Front Neuroanat., 2026, 20, 1717532, doi:10.3389/fnana.2026.1717532

2. 学会発表

1. ヒト型血液脳関門(BBB)-MPSのBBB成熟段階を判定するための品質管理(Quality control: QC)項目の探索-脳微小血管周囲のグリア細胞立体配置およびBBB機能タンパク質発現に関する動物モデルでの検討-, 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 第32回HAB研究機構学術年会(藤沢 2025. 5)
2. Takahashi K, Quan Z, Awakawa T, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. 第48回神経科学学会(新潟 2025. 7)
3. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Hoshikawa K, Sato K The role of microglia on the functional maturation of the blood brain barrier (BBB) in the rat postnatal cerebral cortex (C C). 第68回日本神経化学大会(愛知 2025. 9)
4. 最上(重本)由香里 ミクログリアの新しい生理機能の発掘を目指して ミニ口演 第68回日本神経化学大会(愛知 2025. 9)
5. 生後ラット blood brain barrier (BBB) 発達に伴う脳微小血管周囲グリア細胞立体配置およびBBBタンパク質発現変化に関する検討-BBB-生体模倣システム(MPS)の品質向上を目指して- 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 第153回薬理学会関東部会(山梨 2025. 10)

6. 鈴木孝昌、三島雅之、笠原杏南、最上由香里、高橋華奈子、佐藤 薫、杉山圭一 ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速なDNAメチル化解析 第54回日本環境変異原ゲノム学会（静岡 2025. 11）
7. The temporal expression patterns of brain microvascular endothelial cells' proteins until blood-brain barrier (BBB) maturation-an attempt to make a recipe to determine the BBB developmental stage, Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K, 第3回MPS協議会学術シンポジウム(船堀 2026. 1)
8. Application potential of magnetic resonance imaging (MRI) in preclinical seizure risk evaluation, Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Nakayama-Kitamura K, Suga K, Saito H, Sato K, 第17回日本安全性薬理研究会学術年会(大宮 2026. 2)
9. Analysis of genomic changes and phenotypic alterations associated with cellular senescence in neurons and microglia. 神経細胞、ミクログリアにおける細胞老化にともなうゲノム変化と表現系の解析 Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Suzuki T, Izawa K, Masayuki M, Yanai S, Horibata K, Koizumi S, Sugiyama K, Sato K, 日本薬理学会第99年会（仙台 2026. 3）
10. ミクログリア活性化抑制化合物の探索天然物化合物から合成生物学的に創製したメロテルペノイドライブラリーの活用 Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K, 日本薬学会第146年会(大阪 2026. 3)
11. 生後ラット大脳皮質血液脳関門(BBB)発達と血管周囲グリアの立体配置変動、BBB蛋白質発現変動の関連-BBB-生体模倣システム(MPS)の品質管理項目の抽出- 最上(重本)由香里、北村(中山)貴美子、佐藤 薫, 日本薬学会第146年会(大阪 2026. 3)

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図1 実験の流れ 老齢動物搬入、ゲノム毒性検出法確立、細胞老化指標抽出

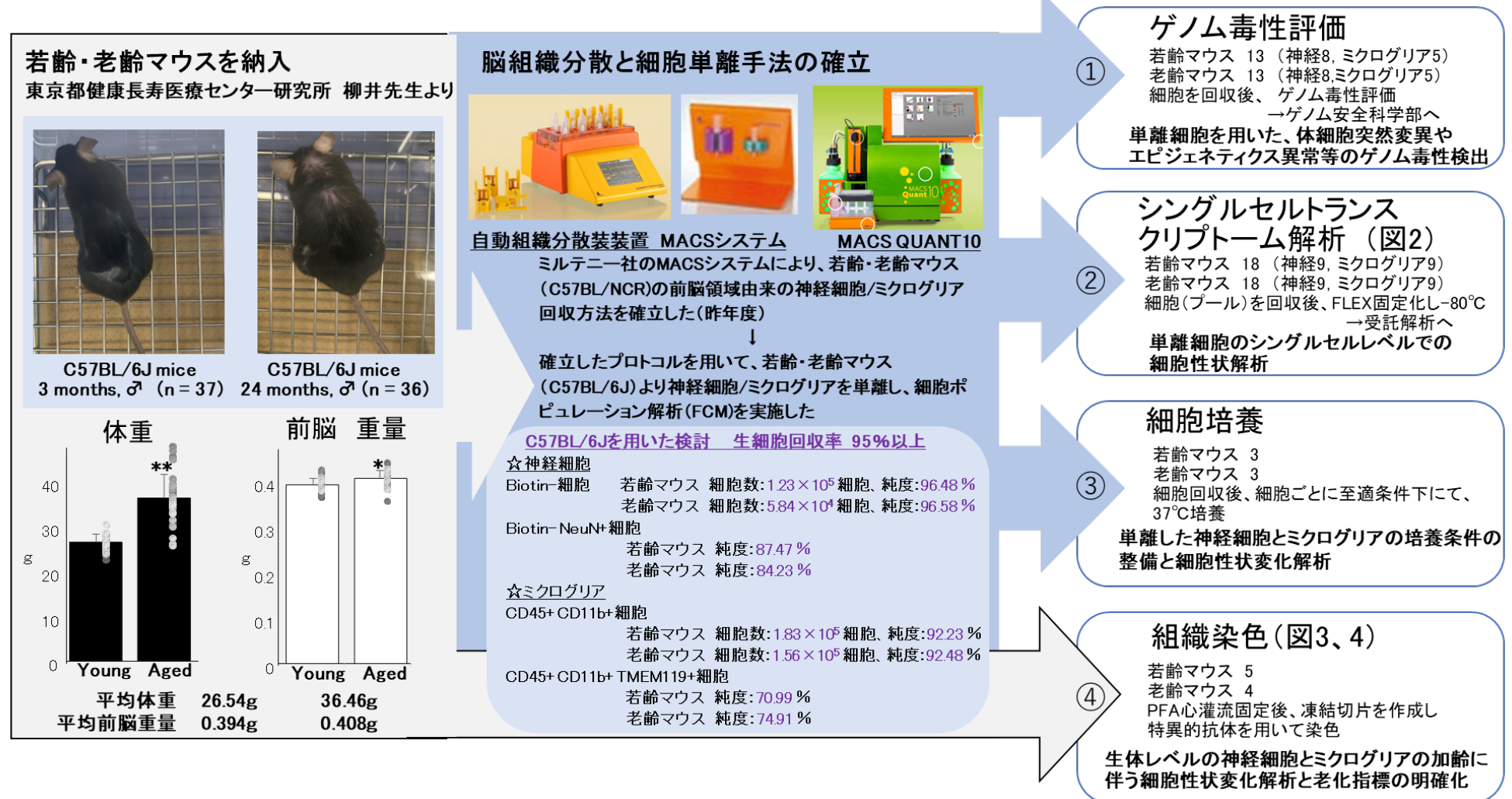
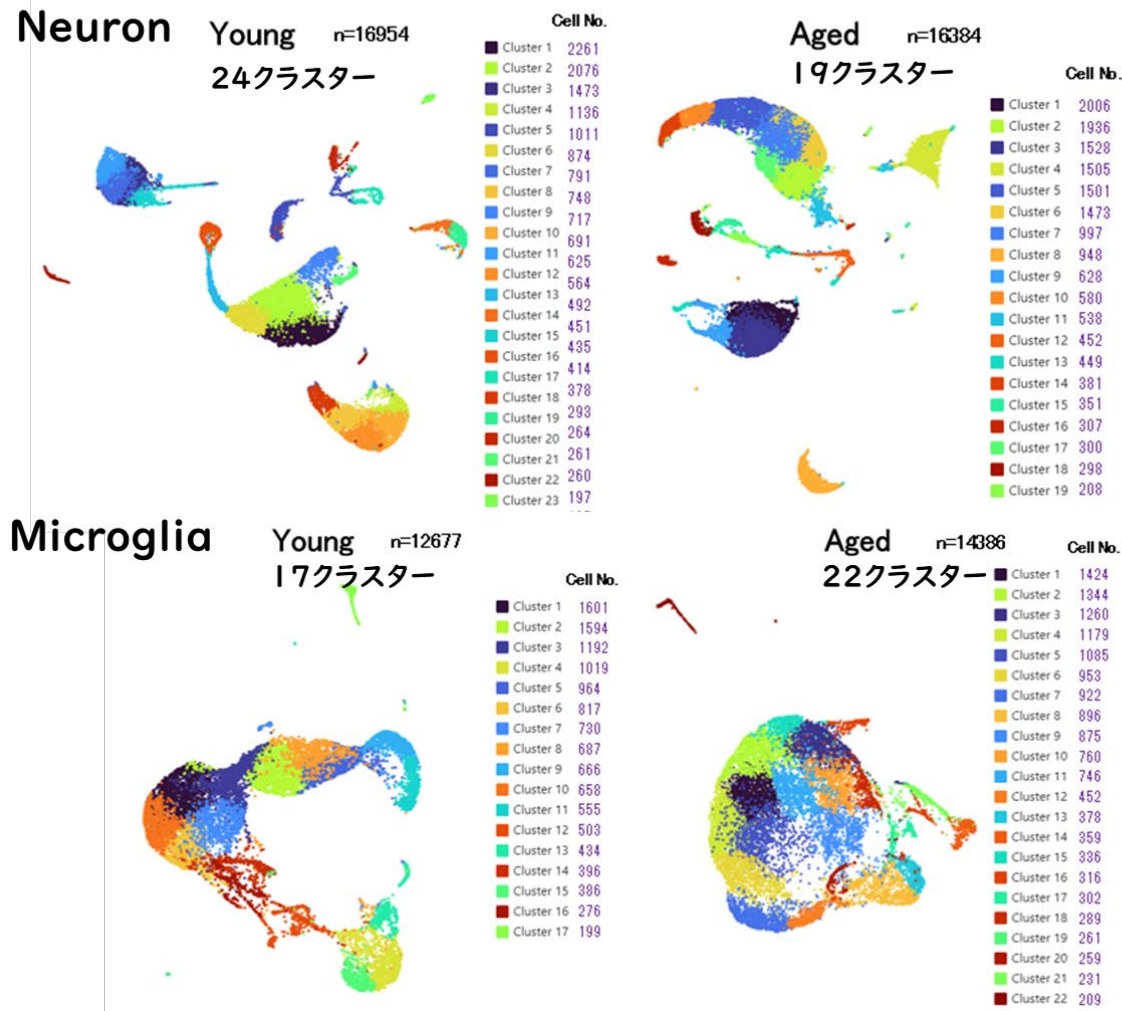


図2 シングルセル解析 概要



- 全解析細胞数 60,853細胞
- Confidently mapped reads in cells 96.8 %
- Fraction of initial cell barcodes passing high occupancy GEM filtering 100%
- Median gene per cell 3175

若齢、老齢神経細胞、若齢、老齢ミクログリア
4サンプルの細胞集団が確認できた



✓高次解析

- Neuron 若齢・老齢
- Microglia 若齢・老齢

✓細分化した細胞種アノテーション解析

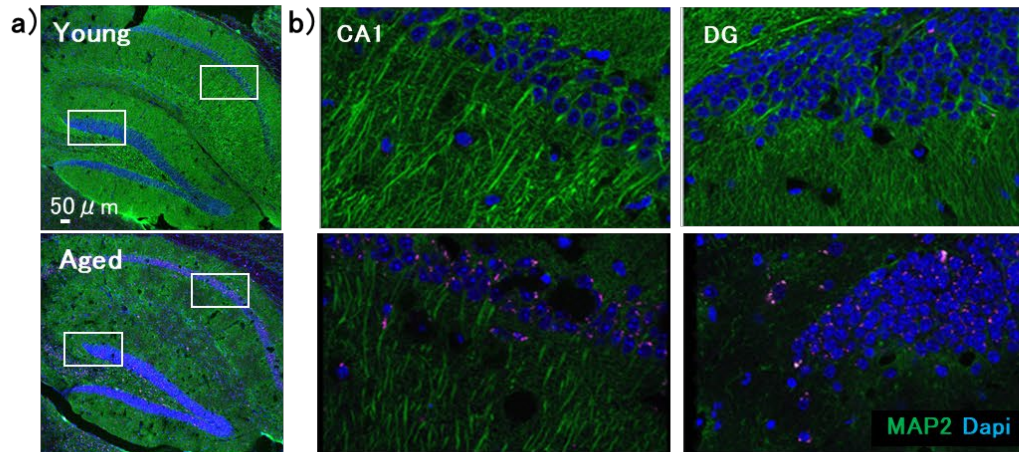
✓遺伝子発現変動解析



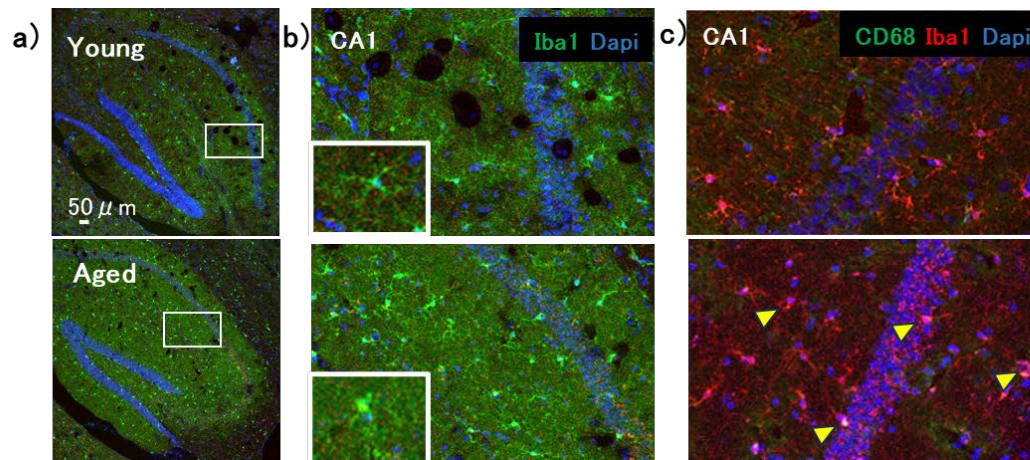
単一細胞レベルの特徴付け
細胞集団の性状変化、老化指標の明確化

図3 マウス海馬領域における神経細胞・ミクログリアの形態学的変化

A 神経細胞; MAP2



B ミクログリア; Iba1, CD68



C ミクログリア; Iba1, CD68

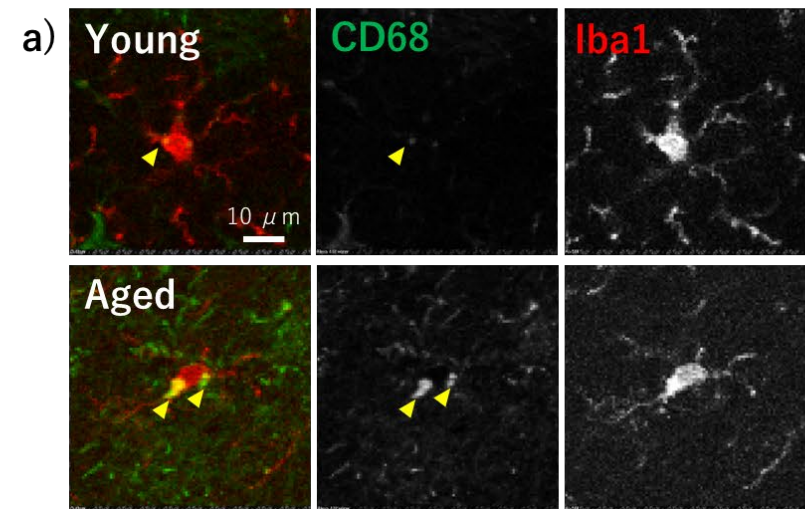
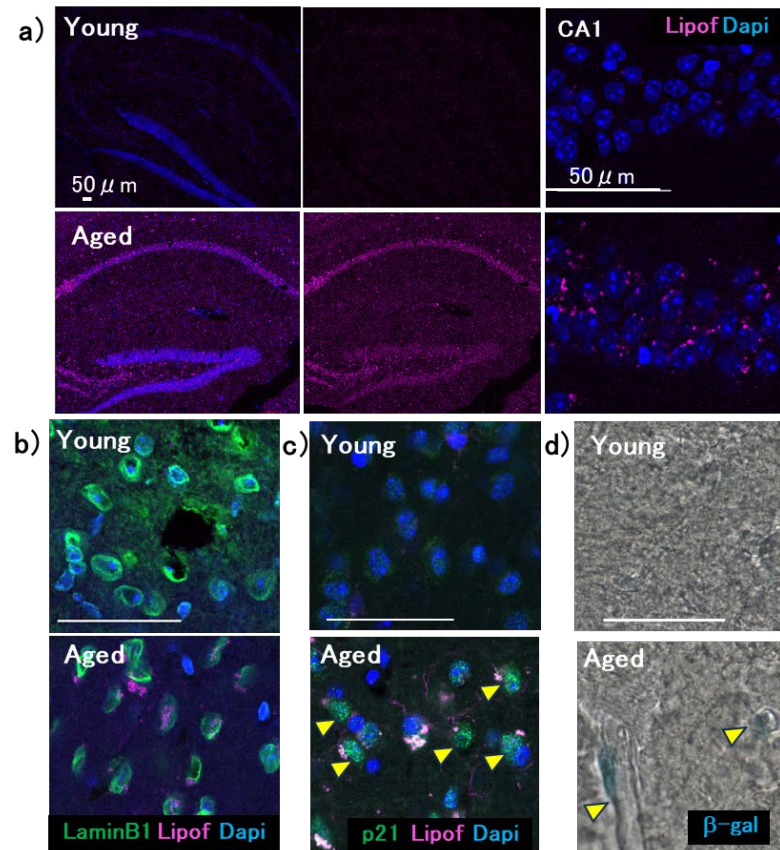


図4 マウス海馬領域における神経細胞・ミクログリアの老化マーカー発現解析

A Lipofuscin, p21, LaminB1, β -galactosidase



参考文献; Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo. Cell 2024 187(16):4150–4175.

B

