

アミロイド β タンパク質による
海馬神経新生抑制機構およびその制御に関する研究

2018

池口 詩織

目次

緒言	1
第一章 $A\beta$ による海馬神経新生抑制メカニズムの解析	4
実験方法	5
実験結果	7
考察	14
第二章 腸内細菌産生脂肪酸による培養ミクログリア活性化抑制作用メカニズムの解析	16
実験方法	17
実験結果	20
考察	27
第三章 $A\beta$ による成体マウス海馬神経新生抑制に対する腸内細菌産生脂肪酸の作用解析	29
実験方法	30
実験結果	32
考察	36
総括および結論	38
謝辞	39
発表論文目録	40
参考文献	41

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成 31 年 3 月 25 日

池口 詩織

緒言

アルツハイマー病は、脳内炎症や神経細胞死などを特徴とする神経変性疾患である。患者数は全世界で推定三千万人に上るにもかかわらず未だ有効な治療法や治療薬が存在しないため、根本的な治療薬の開発が望まれている。

アルツハイマー病は認知症の原因疾患のおよそ 6 割を占めており、進行に伴い記憶障害や見当識障害を発症する。記憶の形成や獲得に重要な海馬歯状回における神経新生の異常がアルツハイマー病患者において観察されることから、海馬神経新生の異常は認知機能の低下に関与していると考えられる。またアルツハイマー病の病理学的特徴として、神経原線維変化および老人斑の出現を伴う脳萎縮などが知られている。老人斑の主要構成成分であるアミロイド β タンパク質は海馬の神経新生を抑制することが報告されているが、その詳細な機序は未だ不明である。

記憶の維持に効果的な物質として、ドコサヘキサエン酸をはじめとした長鎖脂肪酸が知られている。ドコサヘキサエン酸は脳内に移行することで学習記憶改善作用を示すことが報告されている。また、同じ長鎖脂肪酸の一種でありヒトの腸内細菌により産生される腸内細菌産生脂肪酸は、通常の脂肪酸と比べ産生することが困難な脂肪酸であり、消化管内において腸管バリア機能制御、腸管免疫制御機能、炎症抑制作用など免疫に対して重要な働きをもつことが報告されている。しかし、中枢神経系に対する作用については未だ報告されていない。

本研究では、成体マウス海馬において E22P-A β 42 誘発の神経新生障害メカニズム解明を行うと共に、神経新生障害の制御を目的として腸内細菌産生脂肪酸の作用及び作用メカニズムの検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章では、成体マウスを用いて海馬歯状回の神経新生に対して E22P-A β 42 が与える影響を検討し、A β により神経幹細胞の増殖が促進される一方で神経への分化が抑制され、結果的に神経新生の異常を引き起こすことを明らかにした。

第二章では、神経新生異常抑制物質の探索を行う目的で、腸内で抗炎症作用を示す腸内細菌産生脂肪酸に着目し、腸内細菌産生脂肪酸が培養ミクログリア細胞の活性化を抑制する作用を示すことを明らかにした。さらに、腸内細菌産生脂肪酸によるミクログリア活性化抑制メカニズムを明らかにした。

第三章では、成体マウス海馬歯状回において E22P-A β 42 誘発のミクログリア活性化を介した神経新生異常に対して、腸内細菌産生脂肪酸がミクログリア活性化を抑制することで A β 誘発の神経新生異常を正常化することを明らかにした。

これらの研究成果について以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AD	Alzheimer's disease
A β	amyloid β protein
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BrdU	bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DCX	doublecortin
DG	dentate gyrus
DHA	docosahexaenoic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EGTA	ethyleneglycol bis(2-amino-ethylether)tetraacetic acid
EPA	eicosapentaenoic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GPR	G protein-coupled receptor
HYA	10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IGF2	insulin-like growth factor 2
I κ B	Inhibitor κ B
IL-3	interleukin 3
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JNK	c-jun N-terminal kinase
KetoC	10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
NeuN	neuronal nuclei
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NO	nitric oxide
NSPCs	neural stem/progenitor cells
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	polyvinylidene difluoride

RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SGZ	subgranular zone
SVZ	subventricular zone
TBS-T	Tris buffered saline-Tween 20
TLR4	Toll- like receptor 4

第一章

A β による海馬神経新生抑制メカニズムの解析

神経新生は神経幹/前駆細胞が神経へと分化・成熟する現象である。神経新生は胎児期や幼年期に最も活性化するが、成体の脳には神経幹細胞が存在しないため神経新生は発生せず、中枢神経系は損傷を受けると二度と再生することはないとこれまで考えられてきた。しかし近年、ヒトを含む成体哺乳類の海馬歯状回顆粒細胞下帯 (SGZ) と側脳室に面する脳室下帯 (SVZ) において、自己複製能と分化能を有する神経幹/前駆細胞 (NSPCs) が存在し、加齢によりその程度は低下するものの生涯を通じて神経新生が起きていることが報告された (1)。海馬歯状回における神経新生は記憶の形成や獲得に重要な役割を果たしている。海馬歯状回の新生ニューロンは神経可塑性に富み (2)、空間記憶に対して重要な働きを担うことが報告されている (3-5)。しかし、アルツハイマー病 (AD) モデルマウスや AD 患者脳において海馬神経新生の異常が観察される (6-8) ことや、AD の重要な病理学的所見である老人斑の蓄積により新生ニューロン数が減少すること (9) などから、神経新生の異常が AD における認知機能低下に関与することが示唆されている。このため、AD における神経新生異常のメカニズムを解明することは、認知機能障害に対する新たな治療戦略の提示に繋がる可能性がある。

アミロイド β タンパク質 (A β) は 40~42 アミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド前駆タンパク質が β -および γ -セクレターゼによる切断を受けることで産生される (10)。AD における老人斑の主要構成成分の一つであり、神経細胞に対して高い毒性を示し細胞死を惹起するなど (11-12)、AD の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。A β は多様な立体構造を取ることが知られており、A β の構造解析により 22-23 番目にターン構造をとるコンホマーの存在が報告されている (13-14)。さらに、22-23 番目にターン構造をとるコンホマーは、より高い凝集能を持ち、高いラジカル産生能と細胞毒性を有することが示唆されている (15)。A β 42 の 22 番目のグルタミン酸をプロリン残基に置換した変異体 (E22P-A β 42) は 22-23 番目においてターン構造を形成しやすい変異体であり、野生型の A β に比べ顕著に高い凝集活性を有し、PC12 細胞や大脳皮質初代培養細胞を用いた検討において顕著に強い細胞毒性を発現することが報告されている (15-16)。

A β の神経新生への関与について、A β が神経幹/前駆細胞に与える作用に関して統一された見解が得られておらず (17-18)、作用の詳細なメカニズムも未だ明らかとなっていない。

そこで、本研究では成体マウスの海馬における神経新生に着目し、E22P-A β 42 が海馬歯状回における神経新生に与える影響およびそのメカニズムを明らかにした。

実験方法

試薬

5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、ミノサイクリンは和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。ソムノペンチルは共立製薬株式会社 (東京、日本) より、ウシ由来アルブミン (BSA) はナカライテスク株式会社 (京都、日本) より購入した。

動物

実験には 6 週齢の C57BL/6N 系雄性マウス (体重 20-25 g ; 日本 SLC、静岡、日本) を用いた。全てのマウスは室温が $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の条件下で飼育し、餌および水は自由に摂食させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

A β 調製・投与

E22P-A β 42 は F-moc 法により合成した。投与直前に 0.02%アンモニア水に溶解し、氷上に 30 分間静置後に使用した。0.02%アンモニア水 (Vehicle) または E22P-A β 42 を 3 μg 、マウスの脳室内 (bregma より尾側 0.5 mm、左外側 1.0 mm、腹側 2.0 mm) に 4 分間かけて投与した。

BrdU 投与による増殖性細胞の標識

BrdU (100 mg/kg) をマウスの腹腔内に 3 時間毎に 3 回投与、または BrdU (1 mg/mL) を飲水中に 2 週間含ませ、Type-1 細胞および Type-2 細胞を含む増殖性の神経幹/前駆細胞を標識した。

免疫組織化学

マウスをソムノペンチル麻酔下にて開胸し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; 10 mM NaH_2PO_4 、10 mM Na_2HPO_4 、137 mM NaCl 、pH 7.5) を経心還流することで脱血し、4% paraformaldehyde (PFA) を経心灌流し固定した。全脳摘出後、4% PFA 中において 4°C で 2 時間後固定した後、30%スクロース溶液に置換して 4°C で二晩静置した。全脳は -80°C で凍結し、凍結マイクロトーム (LEICA3000 ; Leica, Nussloch, Germany) を用いて厚さ 40 μm の凍結切片を作製した。

脳切片を PBS で 3 回洗浄後、3% BSA / 0.1% Triton-X / PBS で室温にて 60 分間ブロッキングを行い、1% BSA/0.1% Triton-X/PBS に希釈した一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。一次抗体として、抗 BrdU ラット抗体 (ab6326、Abcam、Cambridge、UK) (希釈倍率 1:200)、抗 DCX ウサギ抗体 (#4604S、Cell Signaling Technology) (希釈倍率 1:300)、抗 NeuN マウス抗体 (MAB377、Merck、Darmstadt、Germany) (希釈倍率 1:300)、抗 Iba1 ウサギ抗体 (019-19741、和光純薬工業株式会社) (希釈倍率 1:500) を使用した。一次抗体反応後、二次抗体としてヤギ由来抗ウサギ IgG (H+L) Alexa Fluor 488 標識抗体 (Life Technologiess、California、USA)、ヤギ由来抗マウス IgG (H+L) Alexa Fluor 488 標識抗体 (Life Technologiess) をそれぞれ 1% BSA / 0.1% Triton-X / PBS で希釈し (希釈倍率 ; BrdU 1:500、DCX 1:500、NeuN 1:300 、Iba1 1: 500)、室温で 90 分間反応させた。最後に Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) を 15 分間室温で反応させ核を染色し、FluorSave Reagent にて包埋した。マウス海馬の脳切片は 12 枚ごと (6 枚/匹) に染色を行い、定量結果を 12 倍することで海馬における細胞数とした。

統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。統計学的な有意差は 1-way ANOVA を用いて検定し、事後比較として Tukey's test を用いた。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

神経幹細胞の増殖に対する E22P-A β 42 の作用

神経幹細胞の増殖に対する A β の作用を検討した。E22P-A β 42 (以下 A β) を成体マウスの脳室内に投与した 3 日後、BrdU を 3 時間おきに 3 回腹腔内に投与し神経幹細胞を標識し、海馬歯状回顆粒細胞下帯 (SGZ) の BrdU 陽性の神経幹細胞数を計数したところ、vehicle 投与群と比較して A β 投与群では BrdU 陽性の神経幹細胞数が用量依存的に増加した(図 1-1)。以上の結果より、A β は神経幹細胞の増殖を促進することが明らかになった。

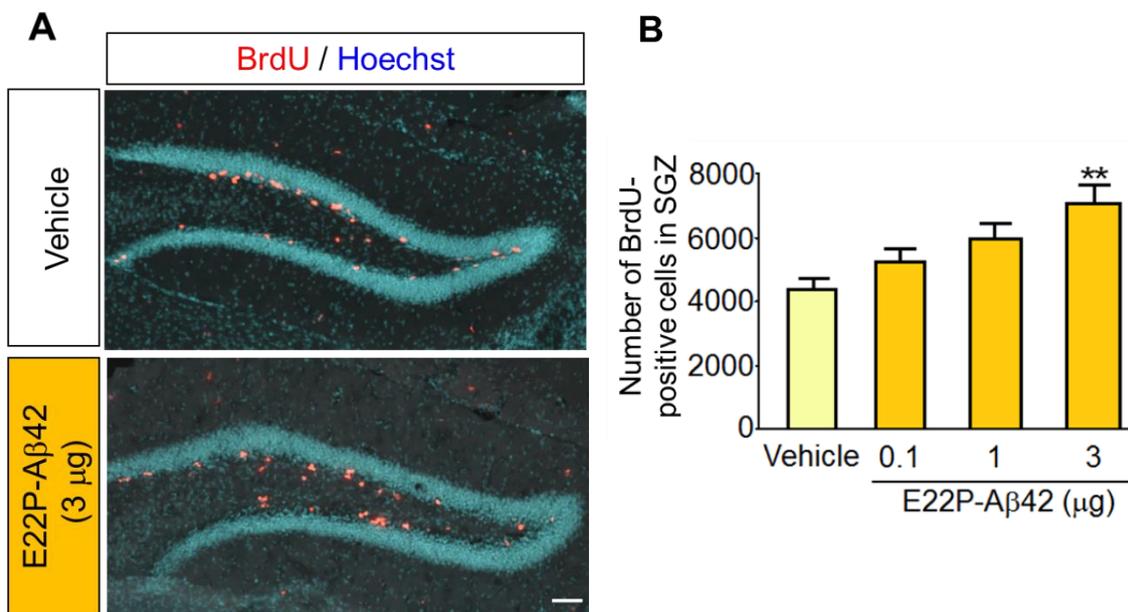


図 1-1 E22P-A β 42 が成体海馬神経幹細胞の増殖に与える影響

(A, B) E22P-A β 42 をマウスの脳室内に投与した 3 日後に BrdU を 3 時間ごとに 3 回投与し、神経幹細胞を標識した。海馬歯状回領域における BrdU 陽性神経幹細胞 (赤) および細胞の核 (青) を、抗 BrdU 抗体および Hoechst を用いた免疫染色により可視化し (A)、SGZ における BrdU 陽性神経幹細胞を定量した (B)。スケールバーは 100 μ m を表す。

** $P < 0.01$ vs. 対照群 (Vehicle)

神経幹細胞の分化に対する A β の作用

次に、A β が神経幹細胞の神経への分化に与える影響について検討を行った。A β を脳室内投与し、神経幹細胞が幼若ニューロンへと分化する 14 日後に海馬歯状回の doublecortin (DCX) 陽性幼若ニューロン数を計数した。その結果、A β 投与により DCX 陽性幼若ニューロン数は有意に減少した (図 1-2)。以上の結果より、A β により神経幹細胞の増殖が亢進したために神経幹細胞の神経への分化が抑制され、結果的に幼若ニューロン数が減少することが明らかになった。

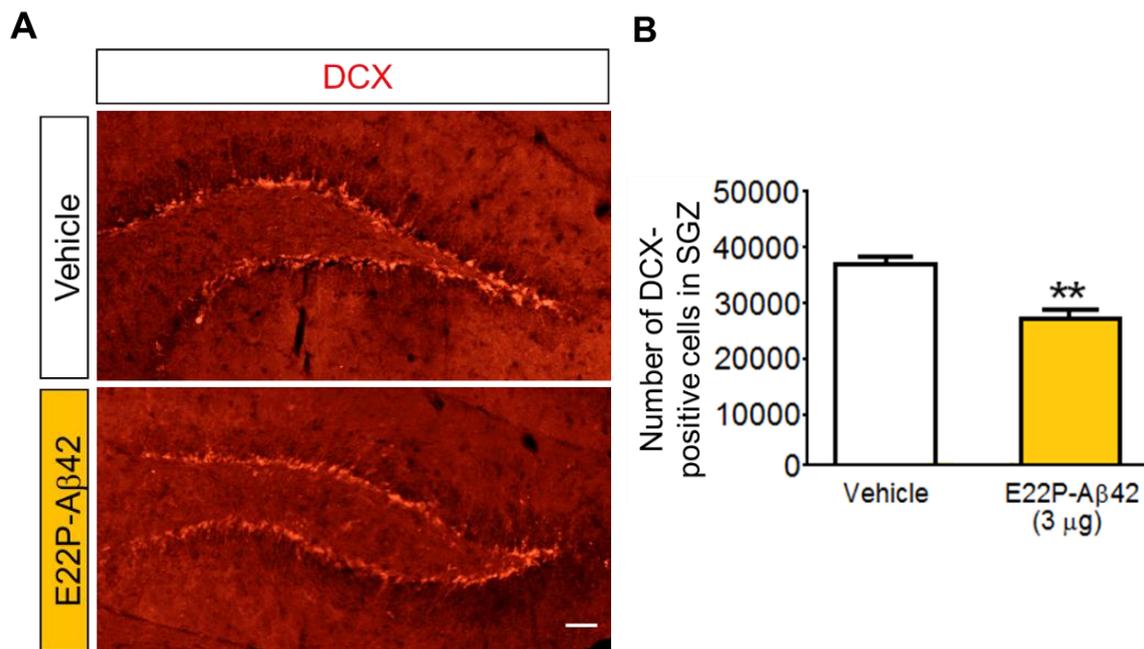


図 1-2 E22P-A β 42 が成体海馬神経幹細胞の分化に与える影響

(A, B) E22P-A β 42 をマウスの脳室内に投与した 14 日後に、SGZ における DCX 陽性幼若ニューロン数 (赤) を、抗 DCX 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、DCX 陽性幼若ニューロン数を定量した (B)。スケールバーは 100 μ m を表す。

** $P < 0.01$ vs. 対照群 (Vehicle)

神経新生に対するAβの作用

次に、神経新生に対する Aβ の作用を検討する目的で新生ニューロン数を確認した。神経幹細胞を BrdU で 14 日間標識した後 Aβ の脳室内投与を行い、神経幹/前駆細胞が成熟ニューロンへと分化する 28 日後に海馬歯状回領域における BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数を計数したところ、Aβ 投与により BrdU 陽性/NeuN 陽性新生ニューロン数が有意に減少した (図 1-3)。この結果から、Aβ はニューロンへの分化を抑制することで成体海馬神経新生異常を引き起こすことが明らかになった。

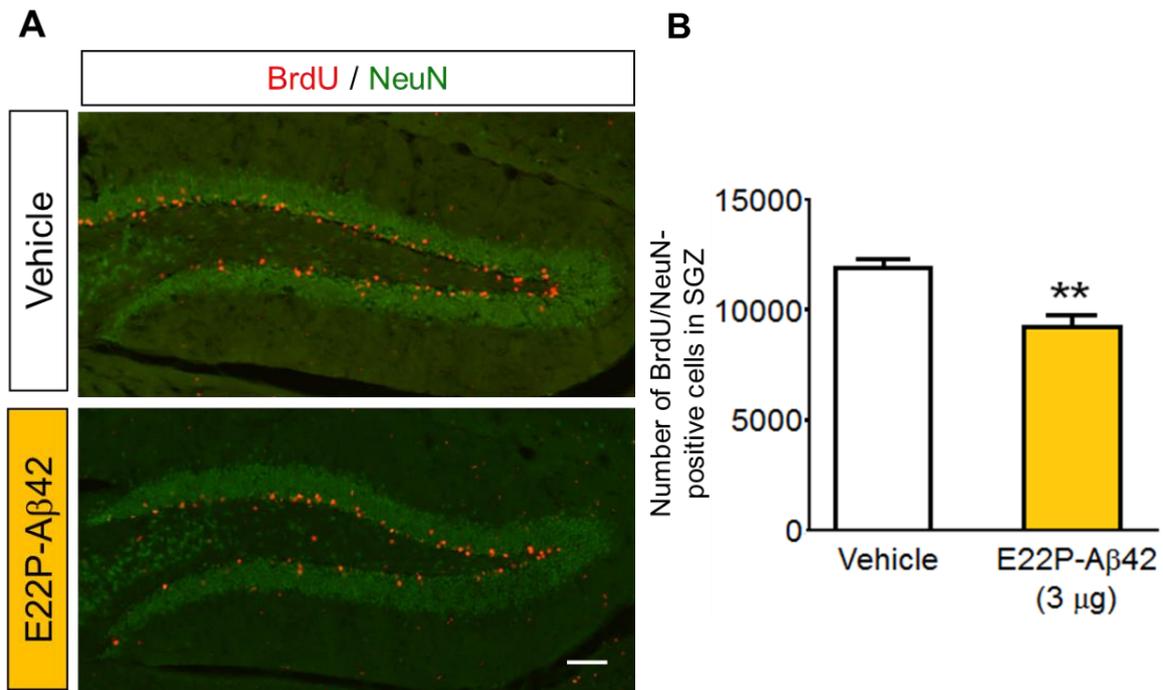


図 1-3 E22P-Aβ42 が成体海馬神経新生に与える影響

(A, B) BrdU をマウスへ飲水により投与し、神経幹細胞を 14 日間標識した。その後、E22P-Aβ42 を脳室内に投与し、28 日後の SGZ における BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数を、抗 BrdU 抗体および抗 NeuN 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数を定量した (B)。スケールバーは 100 μm を表す。

** $P < 0.01$ vs. 対照群 (Vehicle)

海馬ミクログリアの活性化に対するAβの作用

ミクログリアは脳内免疫担当細胞であり、ADモデルマウスにおいてAβプラークの周囲でミクログリアが活性化していることが報告されている (19-21)。また、活性化ミクログリアは成体海馬神経新生を促進または抑制するなどの影響を与えることが報告されているが (22-23)、その詳細は明らかになっていない。そこで、Aβがミクログリアの活性化に与える影響について検討した。Aβ脳室内投与3日後および7日後の成体マウスの海馬におけるIba1陽性のミクログリア細胞数を免疫染色により確認したところ (図 1-4A)、vehicle投与群と比較してAβ投与群において投与3日後のIba1陽性ミクログリア数の有意な増加が見られた (図 1-4B)。一方で、Aβ投与7日後においてはvehicle群と比較しIba1陽性ミクログリア数に有意な差は見られなかった (図 1-4C)。以上の結果より、Aβはミクログリアの一過的な活性化を引き起こすことが明らかになった。

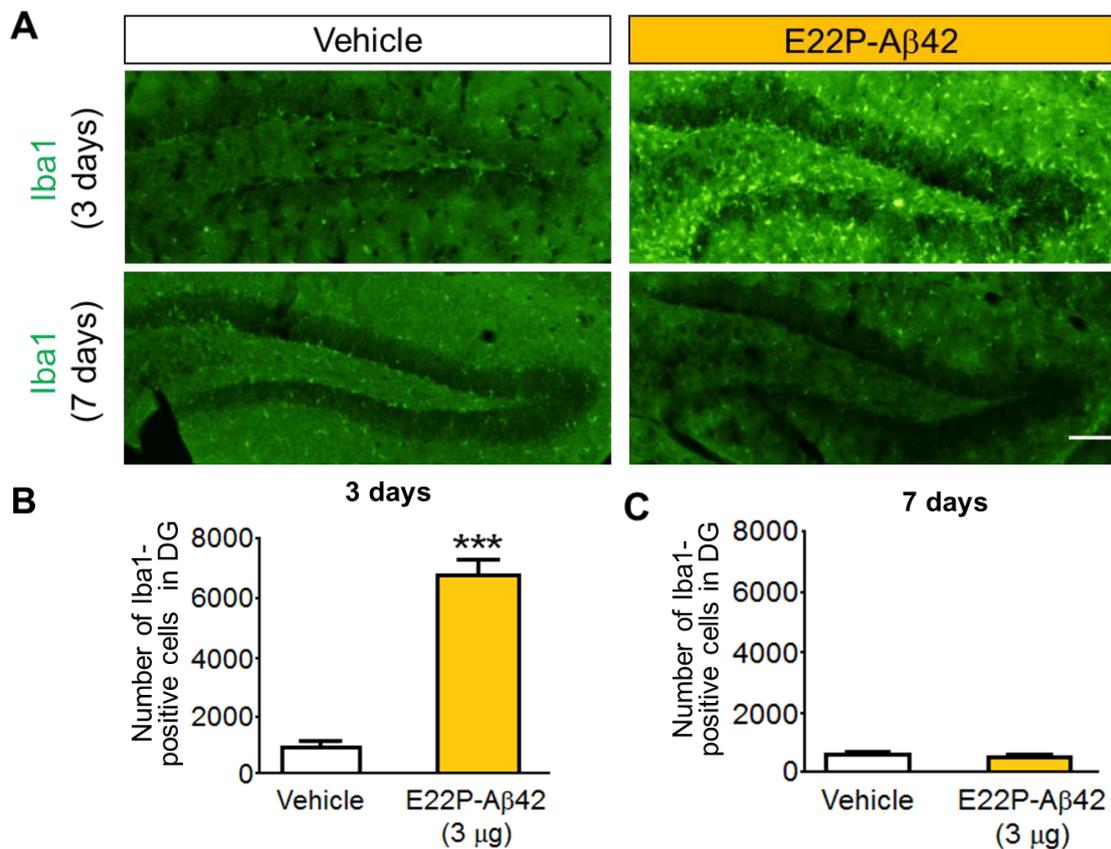


図 1-4 E22P-Aβ42 が成体海馬歯状回におけるミクログリア活性化に与える影響

(A-C) E22P-Aβ42 をマウスの脳室内に投与し、3日後 (B) および7日後 (C) のマウス海馬歯状回 (DG) における Iba1 陽性活性化ミクログリア細胞を、抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、Iba1 陽性の活性化ミクログリア細胞数を定量した (B, C)。スケールバーは 100 μm を表す。

*** $P < 0.001$ vs. 対照群 (Vehicle)

A β 誘発神経新生異常に対するミクログリアの関与

抗生物質のミノサイクリンはミクログリアの活性化を抑制することが知られている(24)。A β の脳室内投与によって引き起こされた神経幹細胞増殖亢進作用へのミクログリアの関与を検討するため、ミノサイクリン(50 mg/kg)をA β 投与12時間前より12時間ごとに腹腔内投与することでミクログリアの活性化を抑制し、A β 投与3日後にBrdU陽性の神経幹細胞数を計数した。ミノサイクリン投与により、A β 投与群におけるIba1陽性ミクログリア数の増加が抑制されることが確認された(図 1-5A, B)。さらに、A β 投与3日後にみられたBrdU陽性増殖神経幹細胞の増加はミノサイクリンの投与により抑制された(図 1-5A, C)。この結果から、A β による神経幹細胞の増殖亢進はミクログリアの活性化を介することが明らかになった。

さらに、A β 誘発神経新生異常に対する活性化ミクログリアの関与について検討した。A β 誘発幼若ニューロン数の減少に対する活性化ミクログリアの影響を確認するために、ミノサイクリン(50 mg/kg)をA β 脳室内投与1日前から24時間ごとに14日間腹腔内投与し、神経幹細胞が幼若ニューロンへと分化する14日後にSGZにおけるDCX陽性幼若ニューロン数を計数した。その結果、ミノサイクリン投与群ではA β 単独投与群と比較して幼若ニューロン数の減少が抑制されていた(図 1-6)。以上の結果より、ミノサイクリン投与によりミクログリアの活性化を抑制することで、A β 誘発の神経幹細胞増殖促進が抑制され、その後の幼若ニューロンへの分化抑制を正常化することが示唆された。

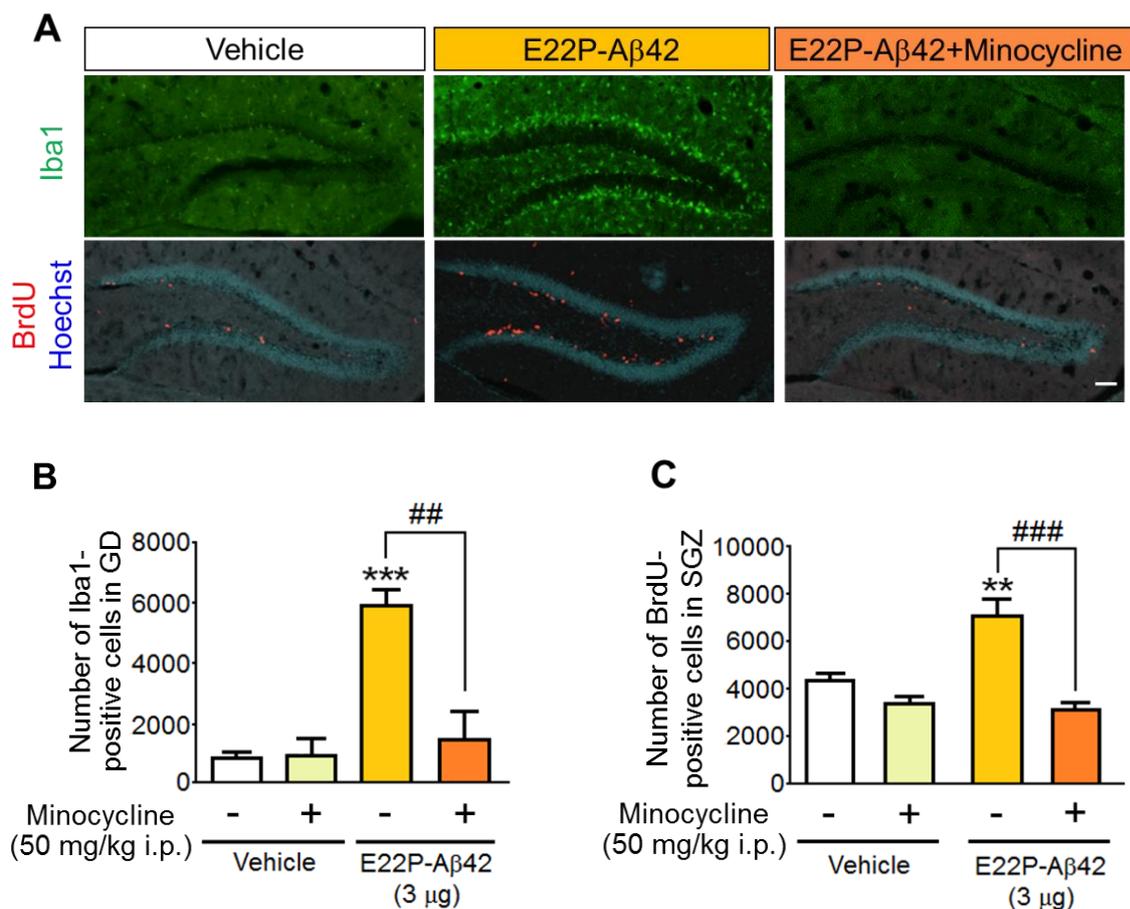


図 1-5 ミノサイクリンが E22P-A β 42 誘発神経幹細胞増殖促進に与える影響

(A-C) ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンを E22P-A β 42 脳室内投与の 12 時間前から 12 時間おきに腹腔内に投与し、E22P-A β 42 投与 3 日後のマウス海馬 SGZ における BrdU 陽性神経幹細胞および DG 領域における Iba1 陽性活性化ミクログリア細胞を、抗 BrdU 抗体、抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、Iba1 陽性の活性化ミクログリア細胞数 (B) および BrdU 陽性の神経幹細胞数 (C) を定量した。スケールバーは 100 μ m を表す。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 対照群 (Vehicle (-)). ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

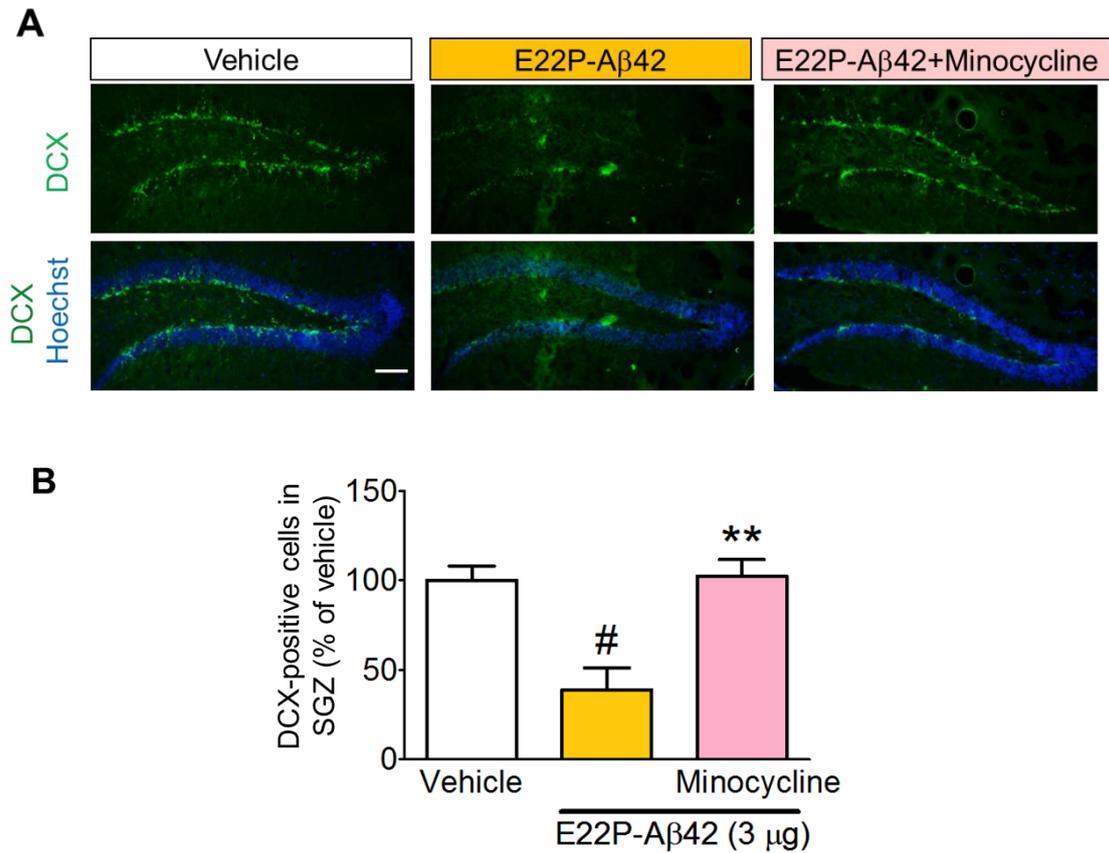


図 1-6 ミノサイクリンが E22P-A β 42 誘発幼若ニューロン減少に与える影響

(A-C) ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリン (50 mg/kg) を E22P-A β 42 脳室内投与の 1 日前から E22P-A β 42 投与後 14 日間に渡り 1 日 1 回腹腔内投与し、SGZ における DCX 陽性幼若ニューロンおよび細胞の核を、抗 DCX 抗体、Hoechst を用いた免疫染色により可視化し (A)、DCX 陽性の幼若ニューロン数を定量した (B)。スケールバーは 100 μ m を表す。 # $P < 0.05$ vs 対照群 (Vehicle) . ** $P < 0.01$ vs. E22P-A β 42.

考察

本研究では、 $A\beta$ が成体マウスの海馬歯状回において、ミクログリアの活性化を介した神経幹細胞の増殖を促進する一方で、ニューロンへの分化を抑制し神経新生異常を誘発することを明らかにした (図 1-7)。

海馬歯状回における神経新生は、増殖性の低い type-1 および増殖性の高い type-2a 神経前駆細胞が増殖し、type-2b 神経前駆細胞が産生され、type-2b 神経前駆細胞から type-3 ニューロblastへの分化、type-3 ニューロblastの成熟・生存という過程を経て新たな顆粒神経が産生され、既存の神経回路に組み込まれる (図 1-7)。また、神経新生における神経幹細胞の増殖、幼若ニューロンの分化、成熟、生存のそれぞれの過程は、様々な因子により制御されていることが知られている (25-27)。本研究において、成体マウスへの $A\beta$ の脳室内投与 3 日後において BrdU 陽性の神経幹細胞は増加したが、投与 14 日後には幼若ニューロン数が、投与 28 日後には新生ニューロン数が有意に減少していた。以上の結果から、 $A\beta$ により神経幹/前駆細胞の増殖が亢進されたために神経前駆細胞の分化が抑制され、結果的に新生ニューロン数が減少することが明らかになった。細胞の増殖と分化のスイッチは様々な遺伝子により制御されている (25-27)。海馬の SGZ において、遺伝子の網羅的解析から insulin-like growth factor (IGF2) が神経幹細胞の増殖に関与していることや (28)、分化に至らなかった神経幹細胞はアポトーシスにより淘汰されることが報告されている (29)。これらの報告から、 $A\beta$ 投与により神経幹細胞の増殖に関連する遺伝子発現が増加し神経幹細胞が増殖したために分化に移行できず、さらに増殖したものの分化できず未分化のままの細胞はアポトーシスにより細胞死を起し、結果的に新生神経数が減少していると考えられる。

これまでにミクログリアはその活性化により神経新生へ影響を与えることが報告されていたため (30-31)、 $A\beta$ による神経幹細胞の増殖亢進のメカニズムについてミクログリアに注目して検討を行った。神経幹細胞の増殖が確認された $A\beta$ 投与 3 日後の海馬を観察したところ、Iba1 陽性の活性化ミクログリア細胞数が有意に増加していた。そこで、ミノサイクリンによりミクログリアの活性化を抑制すると、神経幹細胞の増殖が抑制されることが確認された。以上の結果から、 $A\beta$ による神経幹細胞の増殖亢進のメカニズムはミクログリアの活性化を介することが示唆された。ミクログリアは脳内における免疫担当細胞であり、サイトカインなどの液性因子を産生・放出することが知られている (32-35)。また、その中には BDNF や IL-3 など細胞の増殖を促進するサイトカインも含まれている (32, 34)。このことから、ミクログリア活性化を介した神経幹細胞増殖の詳細なメカニズムに関して、 $A\beta$ により活性化されたミクログリアは細胞増殖を促すサイトカインの放出を増

加させたことで、神経幹細胞の分裂・増殖が惹起され、その後に上記の神経新生異常に繋がると考えられる。

以上より、 $A\beta$ はミクログリアの活性化を惹起することで神経幹細胞の増殖を亢進するが、神経への分化を抑制し、結果的に成体海馬における神経新生を抑制することが明らかとなった。そのため、神経新生を正常化するためにはミクログリアの活性化の制御が必要であると考えられる。

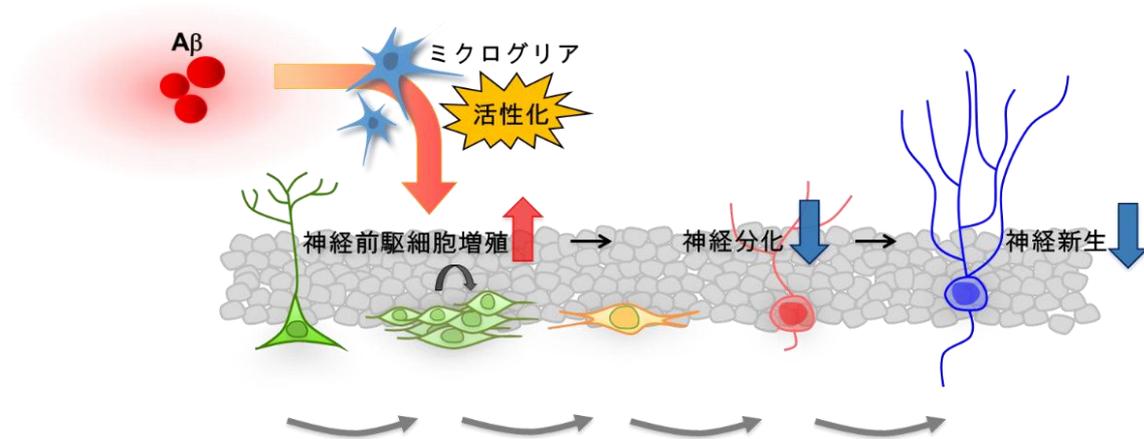


図 1-7 E22P-A β 42 によるミクログリア活性化を介した神経新生異常のメカニズム
E22P-A β 42 は、ミクログリアの活性化を介して神経幹/前駆細胞増殖を促進、幼若ニューロンの減少を引き起こし、神経新生異常を惹起する可能性が考えられる。

第二章

腸内細菌産生脂肪酸による培養ミクログリア 活性化抑制作用メカニズムの解析

ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞であり、炎症などの刺激により活性化されることが報告されている (36-37)。活性化ミクログリアは神経細胞死を引き起こし (38)、炎症性サイトカインや一酸化窒素 (NO) などの様々な炎症メディエーターを分泌することで、脳内炎症に寄与していることが報告されている (39)。脳内炎症は、AD やパーキンソン病などの神経変性疾患の病態において重要な役割を果たしており (40-42)、加齢による神経新生の低下に脳内炎症が関与していることや (43)、前章でミクログリアの活性化が神経新生異常に関与している可能性が明らかになったことなどから、ミクログリアの活性化を抑制することが神経変性疾患において有効な治療戦略となることが考えられる。

リポ多糖 (LPS) は、Toll 様受容体 4 (TLR4) の活性化を介して炎症性サイトカインを放出し炎症反応を惹起する (44)。LPS とその他の内因性のリガンド (45) は TLR4 に結合し、JNK、p38、ERK をはじめとした分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) のリン酸化など下流の経路を活性化する (46-47)。この経路は炎症性サイトカインや誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を増加させ、炎症反応に寄与していることが報告されている (48)。

長鎖脂肪酸の一種である DHA や EPA は炎症性サイトカイン産生抑制作用を示し (49-50)、脳において抗炎症作用を示す (51-53)。中でも DHA は脳内で最も多く存在する長鎖不飽和脂肪酸であり、健康な高齢者や軽度の AD 患者において学習記憶能を改善させることが報告されている (54-55)。DHA と同じ長鎖不飽和脂肪酸の一種である KetoC および HYA は、腸内細菌である *Lactobacillus plantarum* によりリノール酸から産生され (56)、消化管内において腸管バリア機能制御、腸管免疫制御機能、炎症抑制作用など免疫に対して重要な働きをもつことが報告されているが (57)、脳内における作用についての報告は未だない。

本章では、ミクログリアを活性化させる物質として LPS を用い、NO 放出をミクログリア活性化の指標として KetoC 及び HYA が LPS 誘発ミクログリア活性化を抑制することを明らかにした。さらに、両脂肪酸によるミクログリア活性化抑制メカニズムの解明を目的に、炎症反応に関与していると考えられるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)、核内因子 κ B (NF- κ B)、MAPK に着目して検討を行い、MAPK の一種である ERK のリン酸化を抑制することでミクログリアの活性化を抑制することを明らかにした。

実験方法

試薬

ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) および抗生物質 - 抗真菌剤混合溶液はナカライテスク株式会社より購入した。ウシ胎児血清はニチレイバイオサイエンス株式会社 (東京、日本) より購入した。LPS (*Escherichia coli* (O111:B4) 由来) および GW9662 は、Sigma-Aldrich から購入した。10-Oxo-*trans*-11-octadecenoic acid (KetoC) および 10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) は *Lactobacillus plantarum* 由来の酵素を用いて産生した (56) (図 2-1)。AH7614、GW6471 は Cayman Chemical (Michigan、USA) より購入した。

細胞株培養

マウスミクログリア細胞株 (BV-2) は Eui-Ju Choi 教授 (Korea University、Seoul、Korea) の研究室より御供与いただいた (58)。BV-2 は DMEM に 10% 熱非働化ウシ胎児血清、1% 抗生物質 - 抗真菌剤混合溶液を加えた培地を用いて、5% CO₂、37°C 条件下で培養した。

NO 産生量測定

NO の産生量は Griess 法を用いて定量した。ミクログリア培養上清中の亜硝酸塩と Griess 試薬 (2.5% リン酸、1% スルホン酸、0.1% ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩) の反応により生成したジアゾニウムの 540 nm の波長における吸光度を、マイクロプレートリーダーを使用して測定した。

Western blotting

薬物処置後、細胞を TBS で洗浄し細胞溶解液 (1% プロテアーゼ阻害薬カクテル、1% フォスファターゼ阻害薬カクテル、20 mM Tris 塩酸塩、25 mM β-glycerophosphate、2 mM EGTA、1% TritonX-100、1 mM vanadate、1 mM phenylmethlsulfonyl fluoride、2 mM dithiothreitol、pH 7.0) を用いて回収した。Bio-Rad Protein Assay kit によりタンパク濃度を揃えた後、細胞溶解液と等量のサンプル緩衝液 (124 mM Tris、4% SDS、10% glycerol、0.02% bromophenol blue、4% 2-mercaptoethanol、pH 6.8) を混合した。100°C で 5 分間熱処理することでタンパクの変性と SDS 化を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。分離されたタンパクは 15 V の電圧を 75 分間かける

ことにより Immobilon-P PVDF 転写膜 (Millipore, Massachusetts, USA) に転写し、5% スキムミルク含有 TBS-T を用い室温で 1 時間ブロッキング処理を施した。その後、一次抗体として抗 iNOS ウサギ抗体 (No. 610332, BD Transduction laboratories, New Jersey, USA)、抗 β -actin 抗体 (A1978 Sigma-Aldrich)、抗 I κ B ウサギ抗体 (No. 9242, Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 MEK ウサギ抗体 (No. 9121, Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 MAPK ウサギ抗体 (Erk1/2) (No. 9101, Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 JNK/SAPK マウス抗体 (No. 9252, Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 p38 ウサギ抗体 (No. 4631, Cell Signaling Technology) (いずれも希釈倍率 1:1000、抗 β -actin 抗体のみ 1:100000) を用い 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG 抗体、抗マウス IgG 抗体 (いずれも希釈倍率 1:2000, GE Healthcare, IL, USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、Enhanced Chemiluminescence (Plus) Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用い、luminescence image analyzer (LAS-4000, FUJIFILM, 東京, 日本) を用いてバンドを検出した。バンドの発光強度は ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して定量した。

RT-qPCR

BV-2 細胞の mRNA は ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) を使用して回収した。回収した mRNA は、GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) 及び PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TP600; Takara Bio) を用いて逆転写することで cDNA を得た。cDNA に対し、変性 (95°C、15 秒間)、アニリング・伸長 (60°C、60 秒間) で 45 cycles 反応を行い、Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (Takara Bio) を使用して解析を行った。各 mRNA 発現量は、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量を用いて標準化した。PCR には以下のプライマーを使用した。

NOS2 forward : 5'-GAACTGTAGCACAGCACAGGAAAT-3'

NOS2 reverse : 5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAAT-3'

GAPDH forward : 5'-AGTGTAGCCCAGGATGCCCTT-3'

GAPDH reverse : 5'-GCCAAGGTCATCCATGACAAC-3'

RT-PCR

BV-2 細胞の mRNA は ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, USA) を使用して回収した。回収した mRNA を、PrimeScript RT-PCR Kit (Takara Bio, 滋賀、

日本) 及び PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TP600; Takara Bio) を使用し逆転写することで cDNA を得た。cDNA に対し、変性 (95°C、20 秒間)、アニリング・伸長 (60°C、30 秒間) の条件で PCR を行った。40 cycles 反応させ、得た PCR 産物を 3%アガロースゲルにて泳動後、0.1%エチジウムブロマイド存在下、ChemiDoc XRS (Bio-Rad、California、USA) を用いて検出し、Quantity One software (Bio-Rad) を使用して画像を保存した。PCR には以下のプライマーを使用した。

GPR40 forward : 5'-TCTGCCTGGGGCCCTATAAT-3'

GPR40 reverse : 5'-TCCAGGACCTGTTCCCAAGT-3'

GPR120 forward : 5'-AACCTCTTCTGCGCGGATTT-3'

GPR120 reverse : 5'-AAATCGGAATTCCTGGTCCCC-3'

免疫細胞化学

LPS (1 µg/mL) と各脂肪酸 (30 µM) を 1 時間処置した後、BV-2 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、10 mM NaH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、pH 7.5) で 3 回洗浄し、0.2% Triton X-100 含有 PBS で細胞膜透過処理を室温で 30 分間行った。その後、抗 NF-κB p65 ウサギ抗体 (No. 8242、Cell Signaling Technology) (希釈倍率 1:1000) を用い、4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、二次抗体としてヤギ由来抗ウサギ IgG (H+L) Alexa Fluor 488 標識抗体 (Life Technologiess) を用い、室温で 90 分間反応させた。最後に Hoechst 33258 を 15 分間室温で反応させ、核を染色した。

統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。統計学的な有意差は 1-way ANOVA を用いて検定し、事後比較として Tukey's test を用いた。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

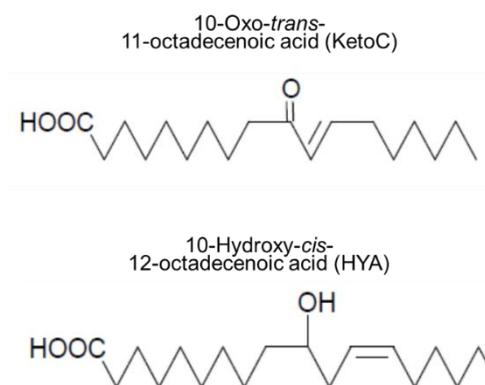


図 2-1 KetoC および HYA の化学構造

実験結果

LPS 誘発 NO 産生及び iNOS 発現増加に対する脂肪酸の作用

LPS はミクログリアを活性化し、活性化したミクログリアは培養上清中に NO を放出することが知られている (59)。そこで、腸内細菌産生脂肪酸である KetoC および HYA を用いて、BV-2 マウスミクログリア細胞における LPS 誘発 NO 産生に対する作用について検討したところ、KetoC および HYA は NO 産生を濃度依存的に抑制した (図 2-2 A, B)。また、ミクログリアを LPS で刺激することにより産生される NO は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により生成される (60)。そこで、LPS 誘発 iNOS 発現に対する脂肪酸の作用をウエスタンブロット法により検討した。LPS を 24 時間処置することで iNOS 発現が増加したが、KetoC および HYA はこれを抑制した (図 2-3 A, B)。さらに、6 時間の LPS 処置により誘発される iNOS の mRNA 発現増加に対して、KetoC および HYA は発現抑制作用を示した (図 2-3 C, D)。この結果から、KetoC および HYA は培養ミクログリア細胞からの NO 産生を、iNOS の発現抑制を介して抑制することが明らかになった。

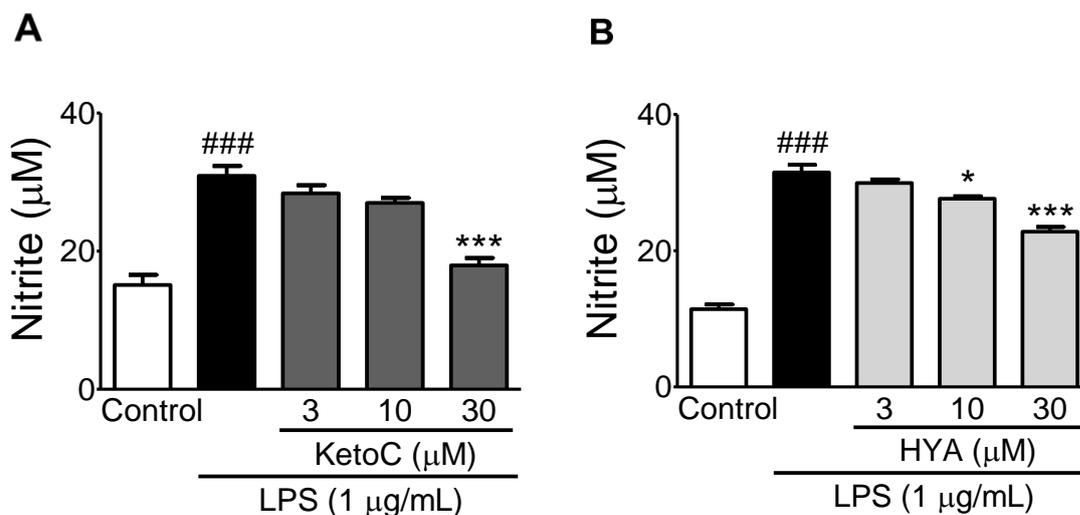


図 2-2 KetoC および HYA が LPS 誘発 NO 産生に与える影響

LPS、KetoC (A) および HYA (B) を BV-2 細胞に 24 時間処置した後、培養液中の NO 産生量を Griess 法により測定した。

$P < 0.001$ vs. control. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. LPS alone.

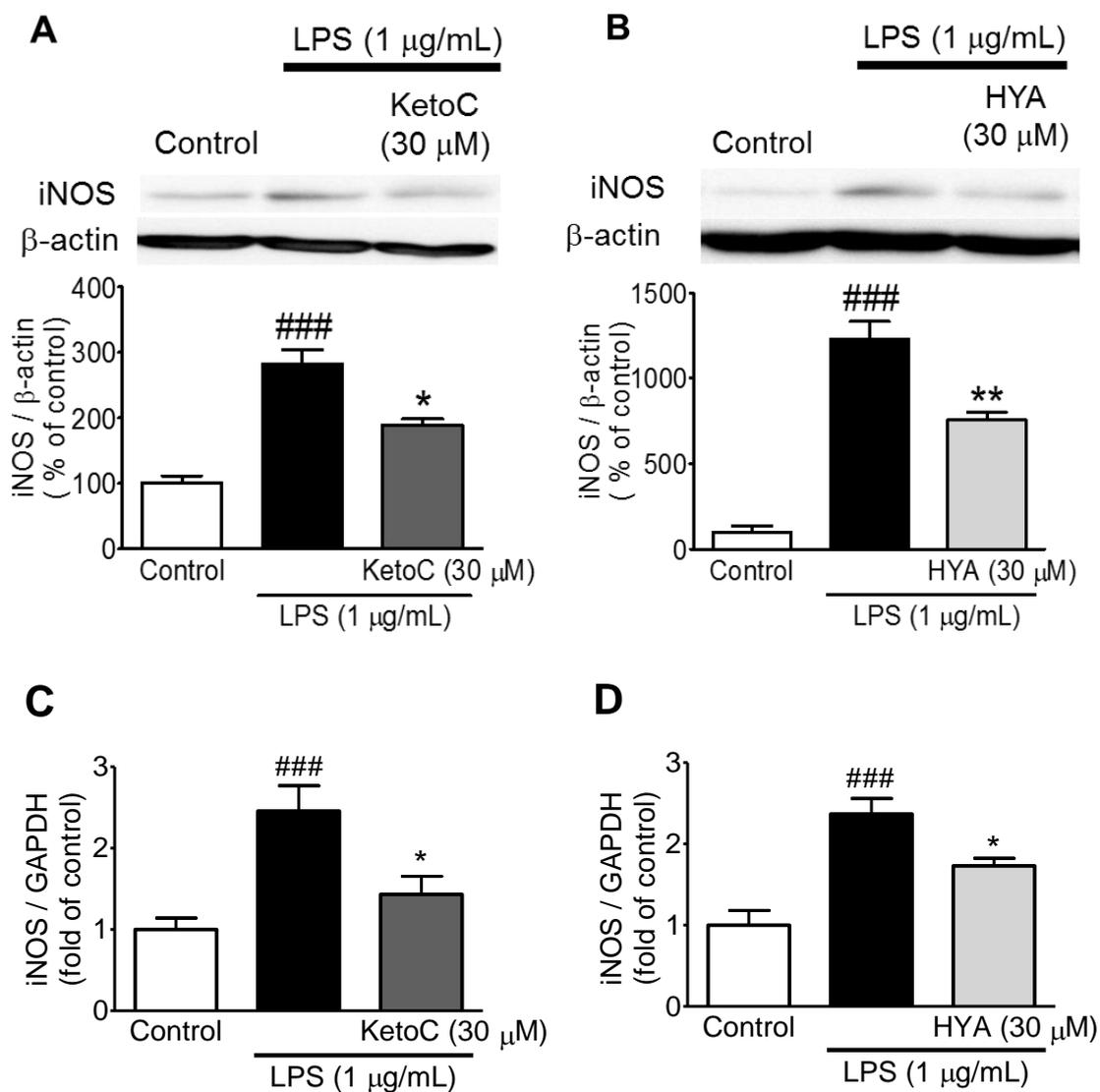


図 2-3 KetoC および HYA が LPS 誘発 iNOS 発現増加に与える影響

LPS、KetoC および HYA を BV-2 細胞に 24 時間処置した後、iNOS のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により定量した (A, B)。LPS、KetoC および HYA を BV-2 細胞に 6 時間処置した後、iNOS の mRNA 発現量を PCR 法により測定した (C, D)。

$P < 0.001$ vs. control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. LPS alone.

HYA による LPS 誘発 NO 産生抑制に対する GPR120 の関与

長鎖脂肪酸は G タンパク質共役型受容体 120 (GPR20) および 40 (GPR40) に結合し、作用を発揮することが知られている (61-62)。そこで、長鎖脂肪酸の一種である KetoC および HYA の NO 産生抑制作用メカニズムを解明する目的で、NO 産生抑制に対する GPR120 および GPR40 の関与について検討した。まず、RT-PCR 法により BV-2 細胞における両受容体の発現を確認したところ、GPR120 が発現している一方で GPR40 の発現は確認できなかった (図 2-4A)。そこで、GPR120 のリガンドである HYA を用いて NO 産生抑制作用への GPR120 の関与について検討を行った。GPR120 受容体拮抗薬である AH7614 を使用し、HYA の抑制作用に与える影響について確認したところ、AH7614 は HYA による LPS 誘発 NO 産生抑制作用に対し影響を与えなかった (図 2-4B)。この結果から、GPR120 は今回の HYA による NO 産生抑制作用に寄与しないことが明らかになった。

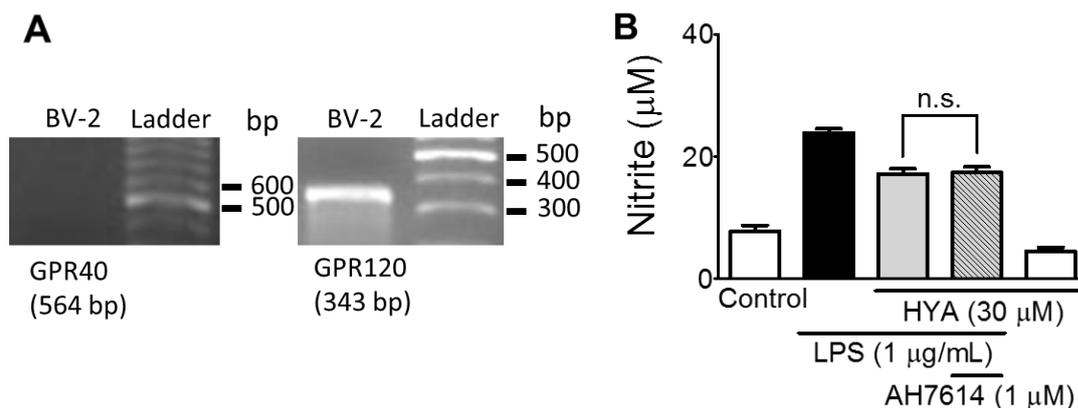


図 2-4 KetoC および HYA の NO 産生抑制作用に対する GPR40、GPR120 の関与

BV-2 細胞において、長鎖脂肪酸受容体である GPR40 および GPR120 の発現を RT-PCR 法により確認した (A)。GPR120 の拮抗薬である AH7614 を LPS および HYA 処置の 1 時間前より前処置し、24 時間後 NO 産生量を Griess 法により測定した (B)。

n.s. : not significant.

KetoC および HYA による LPS 誘発 NO 産生抑制に対する PPAR- α および γ の関与

長鎖脂肪酸はペルオキシソーム増殖剤活性型受容体 (PPARs) のリガンドとなることが報告されている (63)。PPAR- α および PPAR- γ はサイトカイン産生抑制など抗炎症作用に関与しているタンパク質であり、転写因子としての働きを担う (63)。また、KetoC および HYA は PPARs のリガンドとなることが知られている (64)。そこで両脂肪酸の作用に対する PPAR- α および PPAR- γ の関与について検討を行った。PPAR- α 受容体拮抗薬として GW6471 (図 2-5A, B)、PPAR- γ 受容体拮抗薬として GW9662 (図 2-5C, D) を使用し BV-2 細胞にそれぞれ処置したところ、両拮抗薬は KetoC および HYA による LPS 誘発 NO 産生抑制作用に対し影響を与えなかった。これにより、PPAR- α および γ は今回の KetoC および HYA の NO 産生抑制作用に寄与していないことが示唆された。

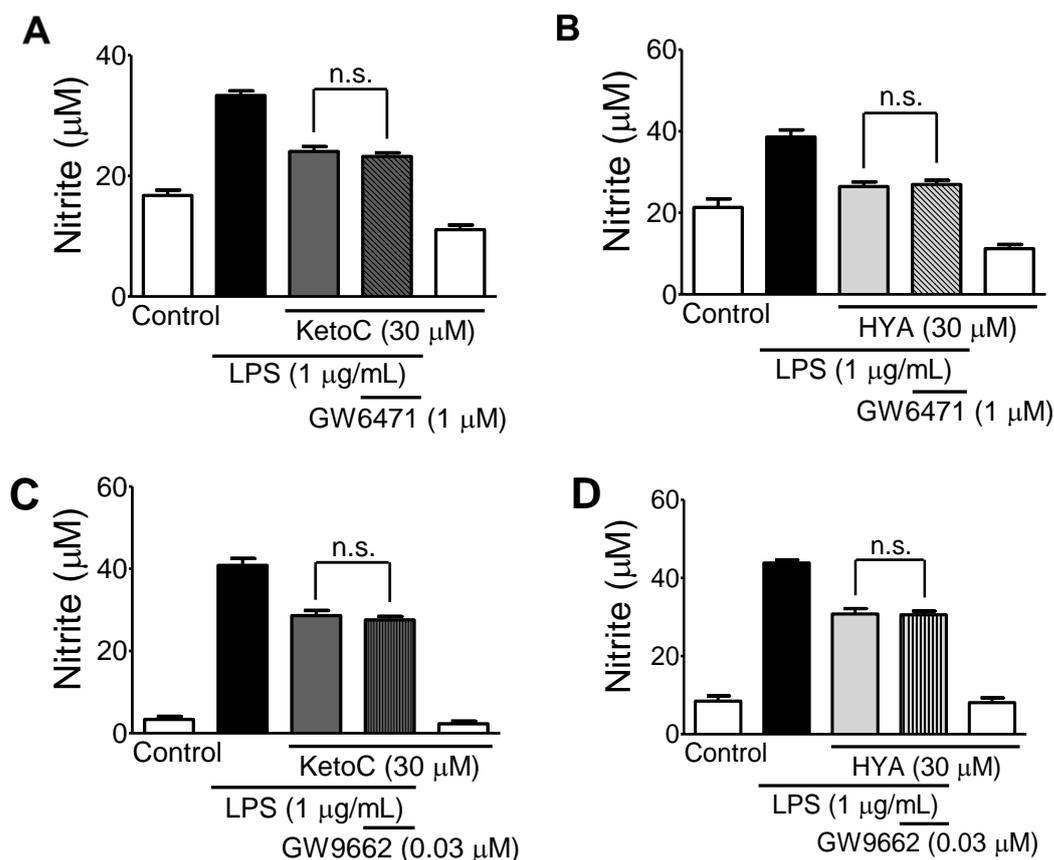


図 2-5 KetoC および HYA の NO 産生抑制作用に対する PPAR- α および γ の関与

PPAR- α の拮抗薬である GW6471 (A, B)、 γ の拮抗薬である GW9662 (C, D) を LPS および KetoC、HYA 処置の 1 時間前より前処置し、24 時間後に培養液中の NO 産生量を Griess 法により測定した。n.s. : not significant.

LPS 誘発 NF- κ B 活性化に対する KetoC および HYA の作用の検討

次に、Toll 様受容体 4 (TLR4) シグナル経路に着目した。LPS は TLR4 を介して NF- κ B 経路を活性化し、この経路の活性化は iNOS の発現増加を引き起こすことが知られている (65)。さらに、NF- κ B は炎症反応に対して重要な役割を果たす転写因子である (66-67)。そこで、KetoC および HYA による NO 産生抑制作用への同経路の関与について検討する目的で、両脂肪酸が NF- κ B 経路に与える影響について検討した。

始めに、BV-2 細胞における LPS 誘発 NF- κ B 核内移行に対する両脂肪酸の作用について検討した。BV-2 細胞を LPS で刺激することにより NF- κ B の核内移行が確認できたが、KetoC および HYA は LPS 誘発の NF- κ B 核内移行に影響を与えなかった (図 2-6A, B)。さらに、LPS 誘発 I κ B 発現に与える影響についてウエスタンブロット法を用いて検討した。NF- κ B は LPS によりリン酸化された I κ B が分解されることで活性化する (68-69)。LPS 処置群では Control 処置群と比較して I κ B が減少したが、LPS 処置群と KetoC および HYA 処置群とを比較して有意な差は見られなかった (図 2-6C)。以上の結果から、今回の KetoC および HYA による NO 産生抑制作用における NF- κ B 経路の寄与が少ないことが明らかになった。

LPS 誘発 MAPK のリン酸化に対する KetoC および HYA の作用の検討

LPS により引き起こされる TLR4 シグナルは MAPKs を活性化し、これが iNOS 発現上昇に関与することが報告されている (70)。また MAPKs 経路は炎症サイトカイン産生や免疫反応の制御など重要な役割を担う経路である (71)。そこで、KetoC および HYA が MAPKs 活性化に与える影響について検討した。LPS 処置後 30 分で MAPKs (ERK、p38、JNK) がリン酸化されることが確認できたため、LPS 処置後 30 分における KetoC および HYA の作用を検討した。その結果、KetoC および HYA は LPS 誘発 p38 および JNK のリン酸化に対しては影響を与えなかったものの (図 2-7C, D)、MEK のリン酸化を抑制する傾向を示し (図 2-7A)、LPS 誘発 ERK リン酸化を有意に抑制した (図 2-7B)。以上の結果から、KetoC および HYA は ERK のリン酸化を抑制することで LPS 誘発の NO 産生を抑制することが明らかになった。

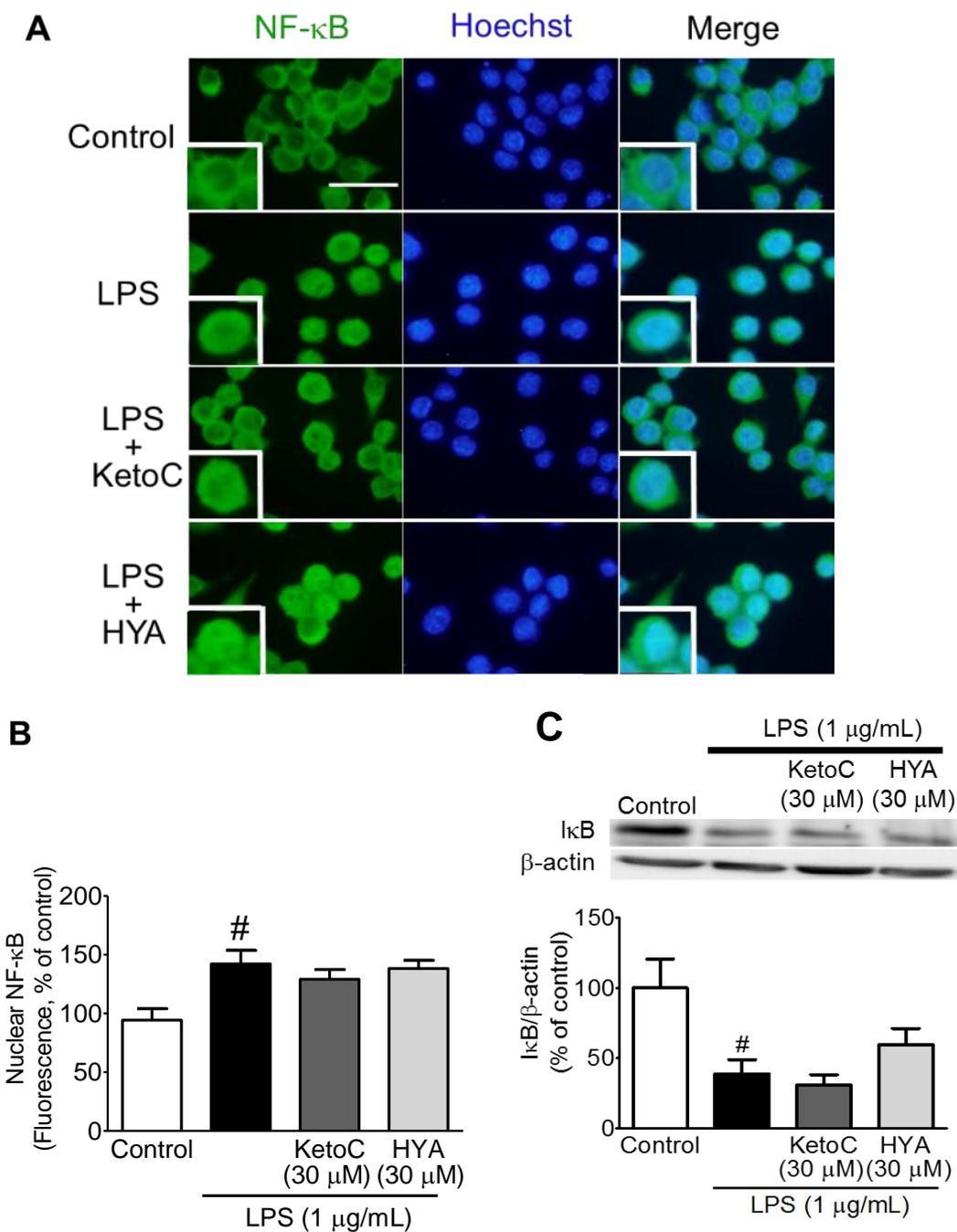


図 2-6 KetoC および HYA の NO 産生抑制作用に対する NF-κB 経路の関与

LPS 誘発 NF-κB の核内移行に対する KetoC および HYA の作用を検討した。BV-2 細胞に LPS および KetoC または HYA を 1 時間処置し、NF-κB (緑) および細胞の核 (青) を、抗 NF-κB p65 抗体および Hoechst を用いた免疫細胞化学により可視化し (A)、核内へ移行した NF-κB を定量した (B)。また、BV-2 細胞に LPS および KetoC または HYA を 30 分間処置し、IkB の発現量をウエスタンブロット法により定量した (C)。

$P < 0.05$ vs. control.

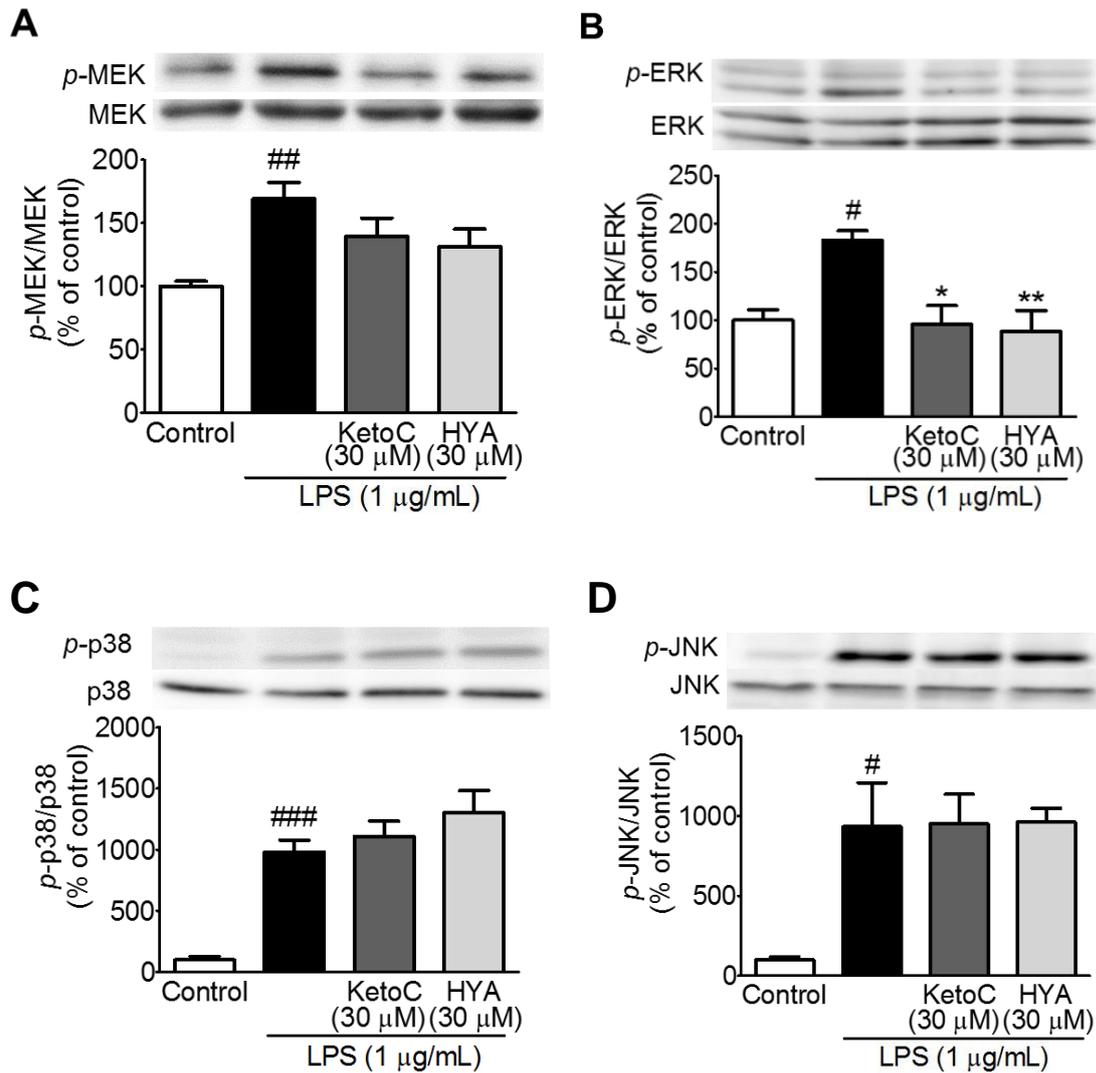


図 2-7 KetoC および HYA の NO 産生抑制作用に対する MAPKs の関与

BV-2 細胞に LPS および KetoC または HYA を 30 分間処置し、p-MEK (A)、p-ERK

(B)、p-p38 (C) および p-JNK (D) の発現量をウエスタンブロット法により確認した。

MEK、ERK、p38 および JNK はそれぞれ内部標準として使用した。

$P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs. control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. LPS alone.

考察

本研究から、KetoC および HYA は培養ミクログリアを LPS 刺激することで産生される NO 放出を抑制することが明らかとなり、ミクログリア活性化に対して抑制作用を持つことが明らかになった。

リノール酸から腸内細菌により産生された脂肪酸が、腸内で抗炎症作用を示すことは以前に報告されている (57)。今回、LPS により培養ミクログリア細胞を活性化させたが、活性化ミクログリアは iNOS 発現および NO 産生を増加させた。NO は活性化ミクログリアから放出されることが知られているため、この NO 産生の増加はミクログリア活性化を反映していると考えられる。また、活性化ミクログリアは様々な神経炎症疾患において重要な役割を担っており、神経細胞死を引き起こすことが報告されている (72-74)。KetoC および HYA は、マウスミクログリア BV-2 細胞において LPS 誘発 NO 産生および iNOS 発現の増加を抑制したが、これは KetoC および HYA がミクログリア活性化抑制作用を持つことを示唆する。

LPS 誘発 NO 産生に対する KetoC および HYA の抑制作用メカニズムを明らかにするため、まず長鎖脂肪酸受容体である GPR120 と PPARs に着目した (61,63)。それぞれの受容体が KetoC および HYA の作用へ関与するか否かについて、各受容体拮抗薬を用いて検討した。しかし GPR120 および PPAR- α 、 γ の受容体拮抗薬は両脂肪酸の作用に影響を与えなかった。この結果は、GPR120 および PPAR- α 、 γ は BV-2 における脂肪酸の LPS 誘発 NO 産生抑制作用に対して寄与が低いことを示唆する。長鎖脂肪酸は GPR40 とも結合し抗炎症作用を発揮することが報告されている (75)。今回、BV-2 細胞での GPR40 発現を RT-PCR 法により確認したが、BV-2 細胞にて GPR40 の発現は確認できなかった。

次に iNOS 発現やサイトカイン産生の制御など、炎症反応に重要な役割を担うことが報告されている NF- κ B に着目した (66)。HK-2 (ヒト腎臓がん細胞株) において、長鎖脂肪酸である DHA や EPA は濃度依存的に LPS 誘発 NF- κ B 活性化を抑制することが報告されている (76)。今回、同様に長鎖脂肪酸の一種である KetoC および HYA について LPS 誘発 NF- κ B 活性化に対する作用を確認したところ、KetoC および HYA は LPS 誘発 I κ B 分解や NF- κ B の核内移行に影響を与えなかった。これらの結果から、BV-2 細胞における両脂肪酸の今回のミクログリア活性化抑制作用について、NF- κ B が寄与していない、または寄与が低いと考えられる。

最後に着目した MAPKs もまたミクログリアにおいて LPS 誘発 iNOS 発現上昇に関与することが報告されている (48)。ERK、p38MAPK や JNK はシグナル伝達経路に関与していることが知られており、この経路は炎症性サイトカイン分泌や iNOS 発現上昇を惹

起する。そこで、LPS 誘発 MAPK のリン酸化による活性化に対する KetoC および HYA の作用を検討したところ、両脂肪酸は ERK のリン酸化を抑制し MEK のリン酸化を抑制する傾向を示した。一方、p38、JNK のリン酸化は抑制しなかった。これらの結果より、KetoC および HYA が直接 LPS 誘発 ERK または MEK のリン酸化を抑制している可能性が考えられる。さらに、Raf (MAPKKK (MAP キナーゼキナーゼキナーゼ)) の抑制が ERK リン酸化を抑制することが報告されている (77-78)。これより KetoC および HYA は、BV-2 細胞において Raf を抑制することで ERK のリン酸化を抑制している可能性も考えられる。

さらに、ERK の下流にある転写因子には NF- κ B だけでなくアクチベータータンパク質 1 (AP-1) がある (79)。今回、iNOS の LPS 誘発 mRNA 発現上昇に対する KetoC および HYA の作用を検討し、両脂肪酸が iNOS の mRNA 発現を抑制することを確認した。このことから、LPS による転写因子の活性化により mRNA 発現上昇が惹起され iNOS の mRNA 発現が増加したが、KetoC および HYA が ERK のリン酸化抑制を介して AP-1 などの転写因子に作用し iNOS の転写を抑制した可能性が考えられる。

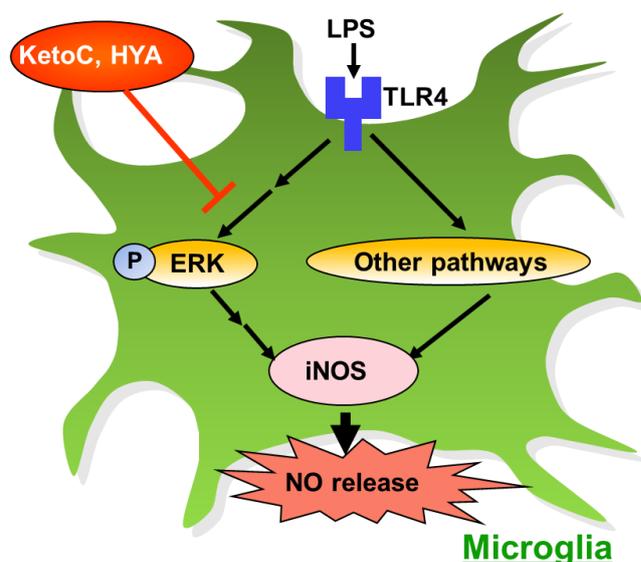


図 2-8 KetoC および HYA の培養
ミクログリア細胞における NO 産生
抑制メカニズム

KetoC および HYA は GPR120 や PPAR、NF- κ B には関与せず、ERK のリン酸化を抑制することで BV-2 細胞における iNOS 発現や NO 産生抑制作用を示すことが確認された。

以上より、BV-2 細胞において KetoC および HYA が LPS 誘発 NO 産生および iNOS 発現を抑制すること、さらにこの抑制作用は ERK のリン酸化抑制を介していることが明らかになった。この結果から、KetoC および HYA が腸管内だけではなく脳内ミクログリア細胞に対しても活性化抑制作用や抗炎症作用を発揮する可能性があることが明らかになった。

第三章

A β による成体マウス海馬神経新生抑制に対する 腸内細菌産生脂肪酸の作用解析

中枢神経疾患は未だアンメットメディカルニーズの高い疾患である。中枢神経疾患の中でも AD やパーキンソン病には有効な治療薬は存在せず、進行を遅らせることが現在の治療の限界となっており、根本的な治療薬の創出が急務となっている。AD は進行性の記憶消失や認知障害を主徴とし (80-81)、進行速度に違いはあるものの最終的には日常生活を送ることが困難となる。現在までの AD の治療薬として、AD 病態の進行を遅らせる目的で開発され脳内アセチルコリンの減少を抑制するアセチルコリンエステラーゼ阻害薬や (82-84)、NMDA 型グルタミン酸受容体に拮抗しグルタミン酸異常を抑制する薬剤 (85)、また根本的な治療を目的とした A β に対する抗体や (86)、AD 患者脳内で確認される神経原線維変化の主成分であるタウタンパク質に対する抗体 (87-88) が研究されている。このように、AD に対して様々な治療アプローチの研究が進められている一方で、AD の主要な病態である認知機能障害に対して重要な役割を担う神経の保護や、神経新生をターゲットとした治療薬は未だ創出されていない。

脳内で作用を発揮する物質にはいくつか報告があり、DHA や EPA を始めとした長鎖脂肪酸もその一つである (51-53)。DHA は血液脳関門を通過できる脂肪酸であることが知られており (89-91)、脳内で抗炎症作用や記憶障害の改善作用を示すことが報告されている (51-55)。

本章では、ミクログリア活性化抑制作用を持つ KetoC および HYA から、より強い活性化抑制作用を持つと考えられる KetoC を使用して、第一章で明らかになった E22P-A β 42 誘発の神経幹細胞増殖亢進やその後の分化抑制に対して KetoC が与える作用を検討し、ミクログリア活性化抑制を介して A β 誘発神経幹細胞増殖亢進を抑制、および最終的に A β 誘発成体海馬ニューロン新生減少を抑制することを明らかにした。

実験方法

試薬

5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) は Sigma-Aldrich から購入し、ソムノペンチルは共立製薬株式会社 (東京、日本) より、ウシ由来アルブミン (BSA) はナカライテスク株式会社より購入した。

動物

第一章実験方法に同じ。

AB調製・投与

第一章実験方法に同じ。

BrdU 投与による増殖性細胞の標識

第一章実験方法に同じ。

免疫組織化学

マウスをソムノペンチル麻酔下にて開胸し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS ; 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, pH 7.5)を経心還流することで脱血し、4% PFA を経心灌流し固定した。全脳摘出後、4% PFA 中において 4°C で 2 時間後固定した後、30%スクロース溶液に置換して 4°C で二晩静置した。全脳は-80°C で凍結し、凍結ミクロトーム (LEICA3000 ; Leica) を用いて厚さ 20 μm の凍結切片を作製した。

BrdU 染色の場合は、抗原賦活化としてマイクロウェーブ法を用いた。クエン酸緩衝液 (10 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) に脳切片を浸し、10 分間マイクロウェーブの照射を行った後、室温で 30 分間冷却してから染色を行った。脳切片を PBS で 3 回洗浄後、3% BSA / 0.1% Triton-X / PBS で室温にて 60 分間ブロッキングを行い、1% BSA / 0.1% Triton-X / PBS に希釈した一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。一次抗体として、抗 BrdU ラット抗体 (NB500-169, Novus Biologicals) (希釈倍率 1:300)、抗 DCX ウサギ抗体 (#4604S, Cell Signaling Technology) (希釈倍率 1:300)、抗 NeuN マウス抗体 (MAB377, Merck) (希釈倍率 1:300)、抗 Iba1 ウサギ抗体 (019-19741, 和光純薬工業株式会社) (希釈倍率 1:500) を使用した。一次抗体反応後、二次抗体としてヤギ由来抗ウサギ IgG (H+L) Alexa Fluor 488 標識抗体 (Life Technologies)、ヤギ由来抗マウス IgG (H+L) Alexa Fluor 488 標識抗体 (Life Technologies) をそれぞれ 1% BSA / 0.1% Triton-X / PBS で希釈し (希

積倍率 ; BrdU 1:400、DCX 1:500、NeuN 1:300、Iba1 1:500)、室温で 90 分間反応させた。最後に Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich)を 15 分間室温で反応させ、核を染色した。

統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。統計学的な有意差は 1-way ANOVA を用いて検定し、事後比較として Tukey's test を用いた。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

成体マウス海馬におけるミクログリア活性化に対する KetoC の作用

第一章および第二章における検討結果を踏まえ、成体マウス海馬におけるミクログリアの活性化に対する KetoC の作用を検討した。E22P-A β 42 および KetoC を脳室内投与した 3 日後、海馬歯状回領域において Iba1 陽性のミクログリア細胞数を計数したところ、E22P-A β 42 の脳室内投与により活性化ミクログリア細胞数が増加したが、この増加は KetoC 投与により用量依存的に抑制された (図 3-1)。これより、KetoC は成体マウス海馬において、A β 誘発のミクログリア活性化を抑制することが明らかになった。

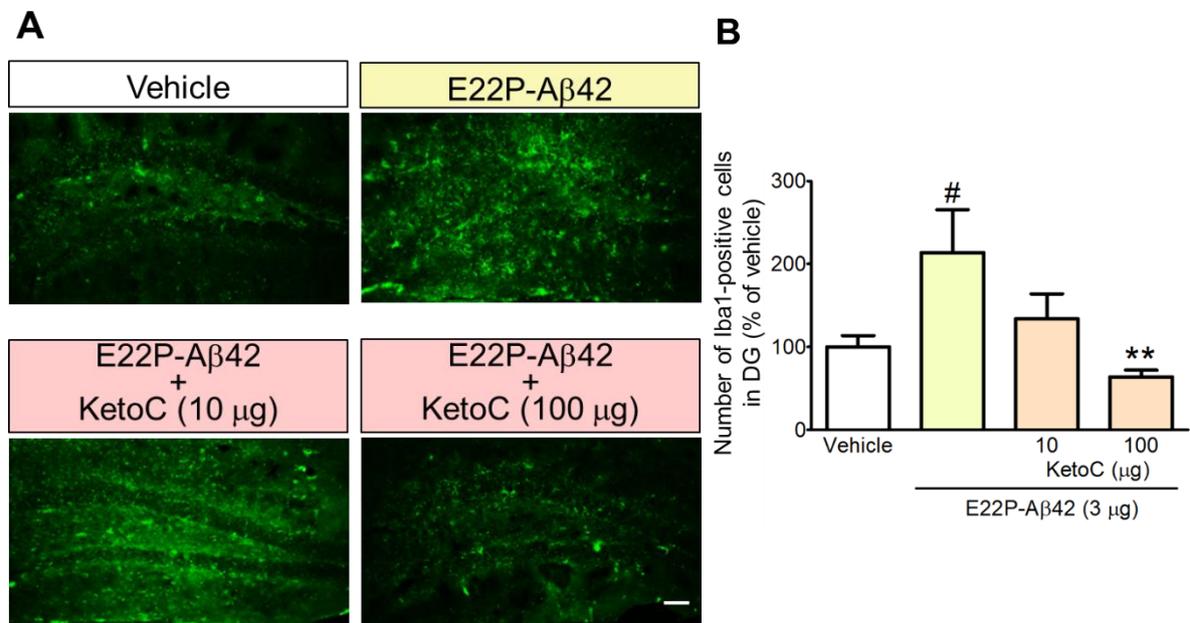


図 3-1 成体マウス海馬における E22P-A β 42 誘発ミクログリア活性化に対する KetoC の作用

(A, B) E22P-A β 42 および KetoC を脳室内に投与し、3 日後の DG における Iba1 陽性活性化ミクログリア細胞を、抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、Iba1 陽性の活性化ミクログリア細胞数を定量した (B)。スケールバーは 100 μ m を表す。

[#] $P < 0.05$ vs. vehicle. ^{**} $P < 0.01$ vs A β alone.

A β 誘発神経幹細胞増殖に対する KetoC の作用

次に、A β 誘発の神経幹細胞増殖に対する KetoC の作用を検討する目的で、E22P-A β 42 を脳室内投与した 3 日後に神経幹細胞を BrdU で標識し、海馬 SGZ の BrdU 陽性の神経幹細胞数を計数した。その結果、E22P-A β 42 の脳室内投与により神経幹細胞の増加が確認されたが、KetoC を投与することでこの増加が抑制された (図 3-2)。この結果から、A β 誘発の神経幹細胞増殖に対し、KetoC は抑制作用を持つことが明らかになった。

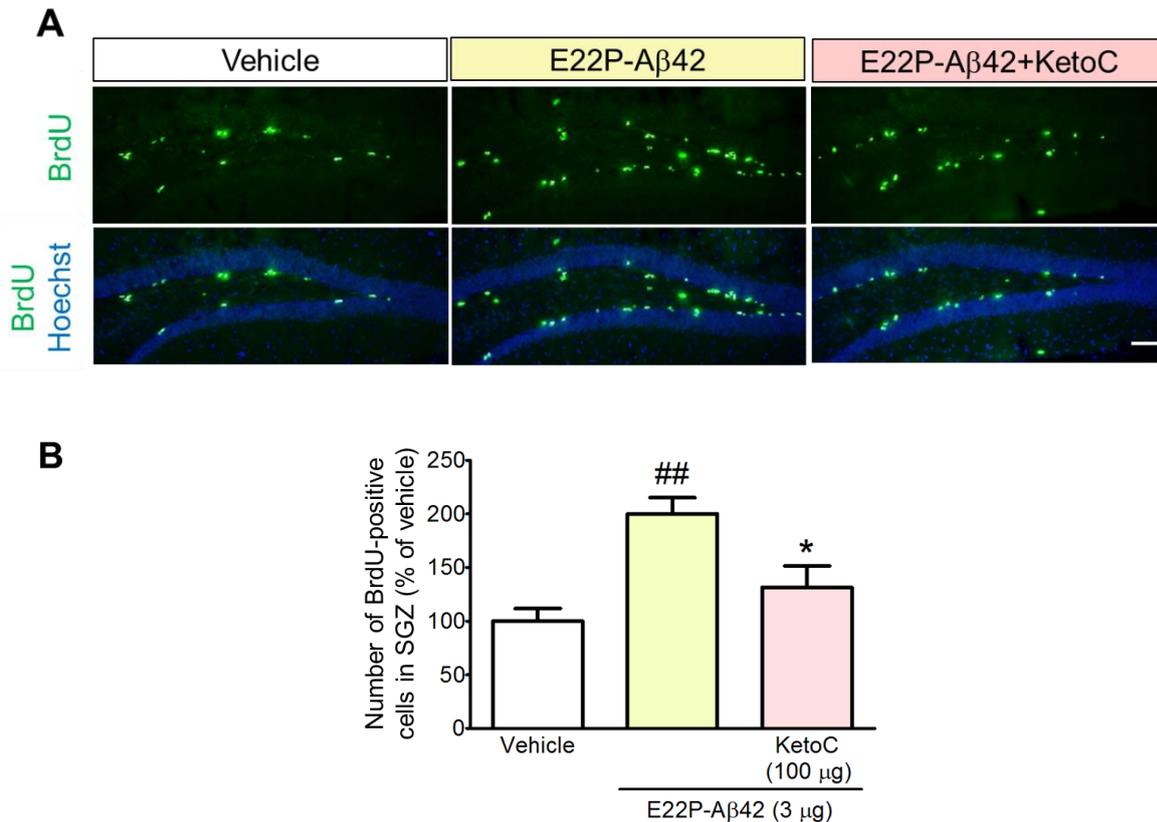


図 3-2 成体マウス海馬における E22P-A β 42 誘発神経幹細胞増殖に対する KetoC の作用

(A, B) E22P-A β 42 および KetoC を脳室内に投与し、3 日後の海馬歯状回 SGZ における BrdU 陽性神経幹細胞および細胞の核を、抗 BrdU 抗体および Hoechst を用いた免疫染色により可視化し (A)、BrdU 陽性の神経幹細胞数を定量した (B)。スケールバーは 100 μ m を表す。

^{##} $P < 0.01$ vs. vehicle. ^{*} $P < 0.05$ vs A β alone.

Aβ誘発神経幹細胞分化抑制に対する KetoC の作用

さらに、Aβ誘発の神経幹細胞の分化抑制に対する KetoC の作用を検討した。神経幹細胞を BrdU で 14 日間標識した後に E22P-Aβ42 および KetoC を脳室内投与し、BrdU 標識された神経幹細胞が幼若ニューロンへと分化する 14 日後に海馬歯状回の DCX 陽性/BrdU 陽性で表される新生幼若ニューロン数を計数した。その結果、E22P-Aβ42 投与群では vehicle 投与群と比較して新生幼若ニューロン数が有意に減少した。しかし、この減少は KetoC 投与により有意に抑制された。この結果から、KetoC は Aβ誘発の神経幹細胞分化抑制を改善することが明らかになった。

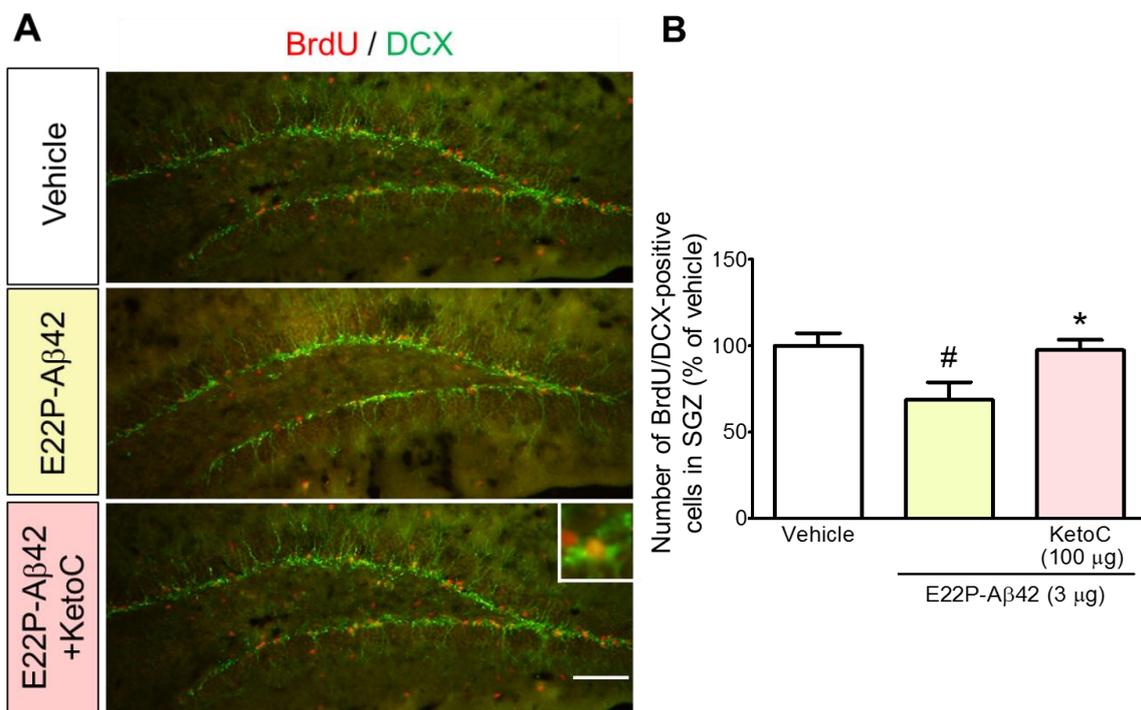


図 3-3 成体マウス海馬における E22P-Aβ42 誘発新生幼若ニューロン数減少に対する KetoC の作用

(A, B)神経幹細胞を BrdU 飲水投与により 14 日間標識した後に E22P-Aβ42 および KetoC を脳室内に投与し、14 日後の海馬 SGZ における BrdU 陽性/DCX 陽性の新生幼若ニューロンを、抗 BrdU 抗体および抗 DCX 抗体を用いた免疫染色により可視化し(A)、BrdU 陽性/DCX 陽性の新生幼若ニューロン数を定量した (B)。スケールバーは 100 μm を表す。

$P < 0.05$ vs. vehicle. * $P < 0.05$ vs Aβ alone.

Aβ誘発神経新生異常に対する KetoC の作用

最後に、Aβ誘発の新生ニューロン数の減少に対する KetoC の作用を検討した。神経幹細胞を BrdU で 14 日間標識し、E22P-Aβ42 および KetoC の脳室内投与 28 日後に海馬歯状回の BrdU 陽性/NeuN 陽性新生ニューロン数を計数した。その結果、E22P-Aβ42 投与群では vehicle 投与群と比較して BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数が有意に減少していることが確認されたが、この新生ニューロンの減少は KetoC 投与により抑制された (図 3-3)。この結果から、KetoC は Aβ誘発の新生ニューロン数の減少を抑制することが明らかになった。

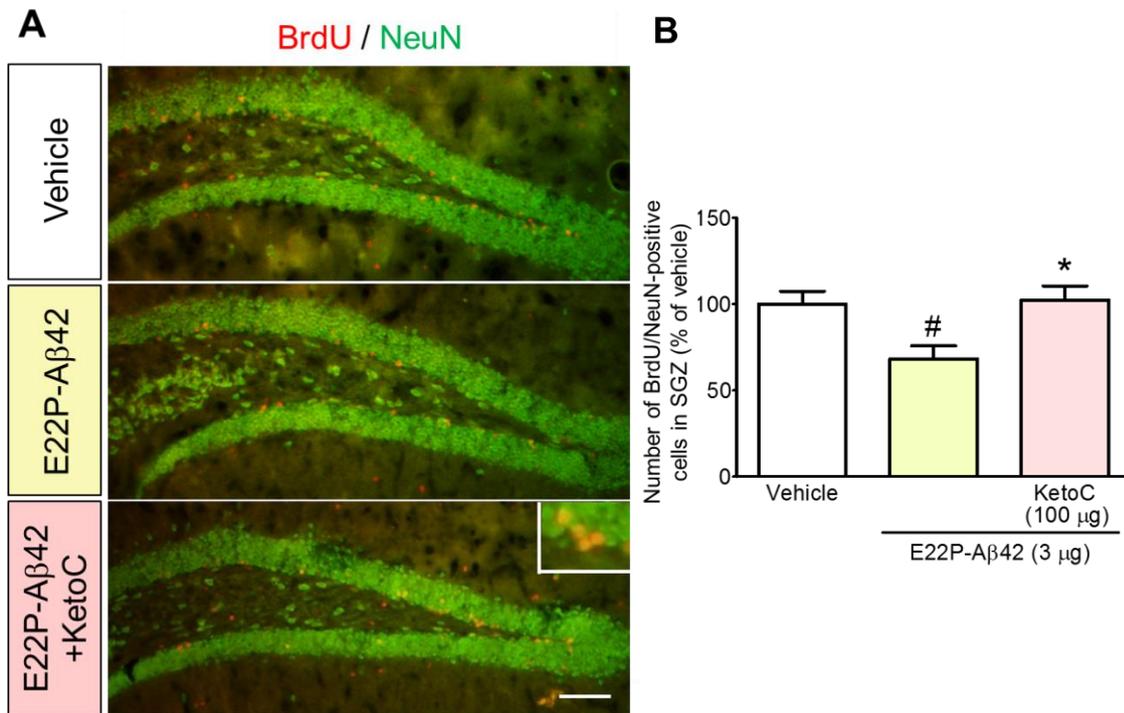


図 3-4 成体マウス海馬における E22P-Aβ42 誘発新生ニューロン数減少に対する KetoC の作用

(A, B) 神経幹/前駆細胞を BrdU 飲水投与により 14 日間標識した後に E22P-Aβ42 および KetoC を脳室内に投与し、28 日後の海馬歯状回 SGZ における BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロンを、抗 BrdU 抗体および抗 NeuN 抗体を用いた免疫染色により可視化し (A)、BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数を定量した (B)。スケールバーは 100 μm を表す。

$P < 0.05$ vs. vehicle. * $P < 0.05$ vs Aβ alone.

考察

本研究では第一章および第二章の検討結果を踏まえ、成体マウス脳内において KetoC の E22P-A β 42 誘発神経新生異常に対する抑制作用について検討し、KetoC が成体マウス海馬において E22P-A β 42 誘発の Iba1 陽性ミクログリア活性化を抑制することや、ミクログリア活性化を介した神経幹細胞の増殖促進、その後の分化抑制による新生幼若ニューロン数の減少、新生成熟ニューロン数の減少に対しても改善作用を発揮することを明らかにした。

A β が成体脳内での神経新生に異常をきたし、これが認知機能障害の一因となることは過去にも報告されている (92-94)。また、第一章の検討結果より A β はミクログリアの活性化を介して神経新生異常を惹起することが明らかになった。このため、ミクログリア活性化を抑制し神経新生を正常化することは、認知機能障害など中枢神経疾患の有効な治療戦略になると考えられる。そこで本研究では、はじめに A β 誘発のミクログリア活性化を介した神経新生異常に対する KetoC の作用を確認した。成体マウス脳室内へ E22P-A β 42 を投与した 3 日後に Iba1 陽性のミクログリア細胞数が増加するが、KetoC はこの増加を抑制した。これは BV-2 細胞を用いた実験で、LPS 誘発のミクログリア活性化が KetoC により抑制されたことと一致する。また、成体マウス脳室内へ LPS を投与した 3 日後に Iba1 陽性のミクログリア細胞数が増加するが、KetoC 投与によりこの増加が抑制されることを確認した (data not shown)。第二章の検討結果から、KetoC は ERK のリン酸化を抑制することでミクログリア活性化を抑制していることが明らかになっており、KetoC は脳内におけるミクログリア細胞の活性化に対しても、ERK のリン酸化抑制することで抑制作用を発揮している可能性が考えられる。

A β 脳室内投与により神経幹細胞の増殖が確認されたが、このメカニズムに関しては第一章で考察したように、ミクログリア活性化による細胞増殖性サイトカインの産生および放出の増加が考えられる (32-35)。今回、A β 脳室内投与による神経幹細胞増加を KetoC が抑制することが確認された。これは、KetoC により海馬におけるミクログリアの活性化が抑制されたことで、細胞増殖性のサイトカイン産生が抑制されたことに起因すると考えられる。また、A β 脳室内投与により新生幼若ニューロン数および新生ニューロン数の減少が確認されたが、KetoC はこれを改善した。このメカニズムに関しても同様に、海馬において A β によるミクログリアの活性化を KetoC が抑制することにより神経幹細胞の過剰な増殖が抑制され、その後の分化へ移行することができたため新生神経細胞数が維持されたのではないかと考えられる。KetoC と同じ長鎖脂肪酸である DHA の中枢神経系に対する作用について、AD 患者の海馬において脳リン脂質中の DHA が健康なヒトの半分に以下に

減少していることや (95)、DHA 摂取による AD の認知機能障害やその他の AD 病態の改善 (96-100)、神経新生の促進 (101) など、様々な作用が報告されている。このことから、KetoC が末梢だけでなく中枢神経においても作用を発揮する可能性があり、中枢神経疾患において新たな治療戦略となることが考えられる。

本研究の結果は、腸内細菌により産生される内在性の長鎖脂肪酸である KetoC が、脳内においてミクログリアの活性化を抑制することで神経新生を正常化させる作用をもつことを明らかにした。さらに、KetoC が末梢器官だけでなく中枢においても有用であるという新たな発見となった。

総括および結論

本研究では、成体マウス海馬における $A\beta$ の神経新生抑制メカニズムの解明、また神経新生異常を抑制する候補化合物として、腸内において抗炎症作用をもつ腸内細菌由来の脂肪酸に着目して検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章では、E22P- $A\beta$ 42 を成体マウスの側脳室に投与することにより、BrdU 陽性の神経幹細胞が増殖する一方で神経分化が抑制され、DCX 陽性の幼若ニューロン数および BrdU 陽性/NeuN 陽性の新生ニューロン数が減少することが明らかになった。また、ミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリンの投与により、 $A\beta$ 誘発神経幹細胞増殖や幼若ニューロン減少が抑制されたことから、 $A\beta$ 誘発の神経新生異常にミクログリアの活性化が関与していることが明らかになった。

第二章では、ミクログリア活性化抑制物質の探索のため、腸内で抗炎症作用を示す腸内細菌産生脂肪酸である KetoC および HYA 着目した。そこで、両脂肪酸が BV-2 細胞において LPS 誘発のミクログリア活性化による NO 産生や iNOS 発現を抑制することを明らかにした。さらに、この抑制作用には PPAR- α および γ の受容体や転写因子である NF- κ B は関与せず、MAPK の一種である ERK のリン酸化抑制を介してミクログリアの活性化を抑制することを明らかにした。

第三章では、成体マウスの海馬において $A\beta$ の脳室への投与により増加した Iba1 陽性活性化ミクログリア細胞が KetoC の投与により減少していたことから、KetoC が脳内においてミクログリア活性抑制作用を示すことを明らかにした。さらに、 $A\beta$ 誘発の BrdU 陽性神経幹細胞の増殖、BrdU 陽性/DCX 陽性新生幼若ニューロンの減少および BrdU 陽性/NeuN 陽性新生ニューロンの減少を KetoC が抑制することが明らかになった。

以上、著者は、成体マウス海馬における $A\beta$ 誘発の神経新生異常メカニズムを明らかにすると共に、腸内細菌産生脂肪酸が培養ミクログリア活性化抑制作用を示すことやその抑制メカニズムを明らかにした。また、この脂肪酸が脳内において $A\beta$ 誘発の神経新生異常を正常化する可能性があることを明らかにした。これらの知見は、神経新生の異常が認知機能障害の一因であると考えられる AD において、 $A\beta$ によるミクログリア活性化を抑制することが新規治療標的となり得ること、さらに腸内細菌産生脂肪酸の中枢における有用性を示唆するものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 久米利明 教授に謹んで感謝の意を表します。また、多くの有益な御助言を頂きました神戸薬科大学薬学部 泉安彦 講師に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学 赤池昭紀 名誉教授、京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授、白川久志 准教授、永安一樹 助教ならびに京都大学医学部附属病院薬剤部 中川貴之 准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、E22P-A β 42 をご提供下さいました京都大学大学院農学研究科 入江一浩 教授、村上一馬 准教授、KetoC および HYA をご提供下さいました京都大学大学院農学研究科 小川順 教授、岸野重信 准教授に深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました澤幡雅仁 博士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた浅岡希美 博士、宮之原遵 博士、猪瀬由莉 学士、松本真実 学士に心からお礼を述べるとともに、同じ研究グループであった牧谷洸希 修士、武政翔大 学士、上村奈々 学士、門脇麻友 学士、川本雄士 学士、中川翔太 修士、熊澤枝里香 学士、宮本萌里 学士、川地隆太 学士、中西涼介 学士、平柴大地 学士、三羽伸明 くん、村上茅佳 学士、二井春香 さん、増田崇 くんをはじめとする京都大学大学院薬品作用解析学分野、および京都大学大学院生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念出来るように終始支えて下さった父 秀志、母 佐登美、および両祖父母に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究は以下の論文にて公表済みである。

第二章

Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation.

(腸内細菌産生脂肪酸である 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid および 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid の BV-2 ミクログリア細胞の活性化に対する抑制作用)

Shiori Ikeguchi, Yasuhiko Izumi, Nahoko Kitamura, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Akinori Akaike, Toshiaki Kume

平成 30 年 9 月発行 *Journal of Pharmacological Sciences* 第 138 巻 9 頁～15 頁に掲載

参考文献

1. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. **132**(4):645-60 (2008).
2. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*. **429**(6988):184-7 (2004).
3. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*. **325**(5937):210-3 (2009).
4. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*. **472**(7344):466-70 (2011).
5. Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*. **149**(1):188-201 (2012).
6. Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. **33**(6):1139-51 (2011).
7. Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired Neurogenesis is an early event in the etiology of Familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. **88**(10):2103-17 (2010).
8. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol*. **67**(1):78-84 (2008).
9. Rodríguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A. Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. **3**(8):e2935 (2008).
10. De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. **6**(2):99-107 (2010).
11. Hosoi T, Kakimoto M, Tanaka K, Nomura J, Ozawa K. Unique pharmacological property of ISRIB in inhibition of A β -induced neuronal cell death. *J Pharmacol Sci*. **131**(4):292-5 (2016).
12. Geetha T, Zheng C, McGregor WC, Douglas White B, Diaz-Meco MT, Moscat J, Babu JR. TRAF6 and p62 inhibit amyloid β -induced neuronal death through p75 neurotrophin receptor. *Neurochem Int*. **61**(8):1289-93 (2012).
13. K. Irie, K. Murakami, Y. Masuda, A. Morimoto, H. Ohigashi, H. Hara, R. Ohashi, K. Takegoshi, H. Fukuda, M. Nagao, T. Shimizu, T. Shirasawa. The toxic conformation of the 42-residue amyloid beta peptide and its relevance to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem*. **7**(10):1001-8 (2007).
14. Masuda Y, Uemura S, Ohashi R, Nakanishi A, Takegoshi K, Shimizu T, Shirasawa T, Irie K. Identification of physiological and toxic conformations in Abeta42 aggregates. *Chembiochem*. **10**(2):287-95 (2009).

15. Morimoto A, Irie K, Murakami K, Masuda Y, Ohigashi H, Nagao M, Fukuda H, Shimizu T, Shirasawa T. Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (A β 42) fibrils by systematic proline replacement. *J Biol Chem.* **279**(50):52781-8 (2004).
16. Izuo N, Kume T, Sato M, Murakami K, Irie K, Izumi Y, Akaike A. Toxicity in rat primary neurons through the cellular oxidative stress induced by the turn formation at positions 22 and 23 of A β 42. *ACS Chem Neurosci.* **3**(9):674-81 (2012).
17. Li L, Xu B, Zhu Y, Chen L, Sokabe M, Chen L. DHEA prevents A β 25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology.* **59**(4-5):323-33 (2010).
18. Kimura T, Hong Nguyen PT, Ho SA, Tran AH, Ono T, Nishijo H. T-817MA, a neurotrophic agent, ameliorates the deficits in adult neurogenesis and spatial memory in rats infused i.c.v. with amyloid-beta peptide. *Br J Pharmacol.* **157**(3):451-63 (2009).
19. Gordon MN, Holcomb LA, Jantzen PT, DiCarlo G, Wilcock D, Boyett KW, Connor K, Melachrinou J, O'Callaghan JP, Morgan D. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse. *Exp Neurol.* **173**(2):183-95 (2002).
20. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* **28**(33):8354-60 (2008).
21. Jung CK, Keppler K, Steinbach S, Blazquez-Llorca L, Herms J. Fibrillar amyloid plaque formation precedes microglial activation. *PLoS One.* **10**(3):e0119768 (2015).
22. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience.* **158**(3):1021-9 (2009).
23. Biscaro B, Lindvall O, Tesco G, Ekdahl CT, Nitsch RM. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* **9**(4):187-98 (2012).
24. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci.* **21**(8):2580-8 (2001).
25. Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara T, Ishidate F, Kageyama R. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science.* **342**(6163):1203-8 (2013).
26. Sakamoto M, Hirata H, Ohtsuka T, Bessho Y, Kageyama R. The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *J Biol Chem.* **278**(45):44808-15 (2003).
27. Ohsawa R, Ohtsuka T, Kageyama R. *Mash1* and *Math3* are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. *J Neurosci.* **25**(25):5857-65 (2005).
28. Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD Jr, Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S. Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* **32**(10):3376-87 (2012).
29. Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W, Yu SW. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain.* **9**:43 (2016).

30. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*. **158**(3):1021-9 (2009).
31. Biscaro B, Lindvall O, Tesco G, Ekdahl CT, Nitsch RM. Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. **9**(4):187-98 (2012).
32. Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther*. **109**(1-2):210-26 (2006).
33. Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res*. **29**(5):1017-38 (2004).
34. Gebicke-Haerter PJ, Appel K, Taylor GD, Schobert A, Rich IN, Northoff H, Berger M. Rat microglial interleukin-3. *J Neuroimmunol*. **50**(2):203-14 (1994).
35. Kirkley KS, Popichak KA, Afzali MF, Legare ME, Tjalkens RB. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation*. **14**(1):99 (2017).
36. Ferrari CC, Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis*. 2011:436813 (2011).
37. Carniglia L, Ramírez D, Durand D, Saba J, Turati J, Caruso C, Scimonelli TN, Lasaga M. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017:5048616 (2017).
38. Bialas AR, Presumey J, Das A, van der Poel CE, Lapchak PH, Mesin L, Victora G, Tsokos GC, Mawrin C, Herbst R, Carroll MC. Microglia-dependent synapse loss in type I interferon-mediated lupus. *Nature*. **546**(7659):539-543 (2017).
39. Pocivavsek A, Burns MP, Rebeck GW. Low-density lipoprotein receptors regulate microglial inflammation through c-Jun N-terminal kinase. *Glia*. **57**(4):444-53 (2009).
40. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. **140**(6):918-34 (2010).
41. Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. *Biomed Res Int*. 2015:628192 (2015).
42. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. **108**(6):1343-59 (2009).
43. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. **477**(7362):90-4 (2011).
44. Nijland R, Hofland T, van Strijp JA. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. *Mar Drugs*. **12**(7):4260-73 (2014).
45. Vilahur G, Badimon L. Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor. *Front Physiol*. **5**:496 (2014).
46. Piala AT, Humphreys JM, Goldsmith EJ. MAP kinase modules: the excursion model and the steps that count. *Biophys J*. **107**(9):2006-15 (2014).

47. Ju Woo H, Jun DY, Lee JY, Park HS, Woo MH, Park SJ, Kim SC, Yang CH, Kim YH. Anti-inflammatory action of 2-carbomethoxy-2,3-epoxy-3-prenyl-1,4-naphthoquinone (CMEP-NQ) suppresses both the MyD88-dependent and TRIF-dependent pathways of TLR4 signaling in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* **205**:103-115 (2017).
48. Gaikwad S, Naveen C, Agrawal-Rajput R. Toll-like receptor-4 antagonism mediates benefits during neuroinflammation. *Neural Regen Res.* **11**(4):552-3 (2016).
49. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr.* **21**(6):495-505 (2002).
50. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* **83**(6 Suppl):1505S-1519S (2006).
51. Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N Jr, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron.* **43**(5):633-45 (2004).
52. Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibashi Y, Oka J, Shido O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem.* **81**(5):1084-91 (2002).
53. Borsini A, Alboni S, Horowitz MA, Tojo LM, Cannazza G, Su KP, Pariante CM, Zunszain PA. Rescue of IL-1 β -induced reduction of human neurogenesis by omega-3 fatty acids and antidepressants. *Brain Behav Immun.* **65**:230-238 (2017).
54. Yurko-Mauro K, McCarthy D, Rom D, Nelson EB, Ryan AS, Blackwell A, Salem N Jr, Stedman M; MIDAS Investigators. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement.* **6**(6):456-64 (2010).
55. Sinn N, Milte CM, Street SJ, Buckley JD, Coates AM, Petkov J, Howe PR. Effects of n-3 fatty acids, EPA v. DHA, on depressive symptoms, quality of life, memory and executive function in older adults with mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. *Br J Nutr.* **107**(11):1682-93 (2012).
56. Kishino S, Takeuchi M, Park SB, Hirata A, Kitamura N, Kunisawa J, Kiyono H, Iwamoto R, Isobe Y, Arita M, Arai H, Ueda K, Shima J, Takahashi S, Yokozeki K, Shimizu S, Ogawa J. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**(44):17808-13 (2013).
57. Miyamoto J, Mizukure T, Park SB, Kishino S, Kimura I, Hirano K, Bergamo P, Rossi M, Suzuki T, Arita M, Ogawa J, Tanabe S. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J Biol Chem.* **290**(5):2902-18 (2015).
58. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol.* **27**(2-3):229-37 (1990).
59. Leonoudakis D, Rane A, Angeli S, Lithgow GJ, Andersen JK, Chinta SJ. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Natural Product Securinine in Activated Glial Cells: Implications for Parkinson's Disease. *Mediators Inflamm.* 2017:8302636 (2017).
60. Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid Redox Signal.* **8**(5-6):949-54 (2006).

61. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. **142**(5):687-98 (2010).
62. Mancini AD, Poitout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol Metab*. **24**(8):398-407 (2013).
63. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*. **13**:17 (2014).
64. Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **114**:28-34 (2016).
65. Badshah H, Ali T, Kim MO. Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway. *Sci Rep*. **6**:24493 (2016).
66. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **1**(4):a000034 (2009).
67. Verzola D, Bonanni A, Sofia A, Montecucco F, D'Amato E, Cademartori V, Parodi EL, Viazzi F, Venturelli C, Brunori G, Garibotto G. Toll-like receptor 4 signalling mediates inflammation in skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. **8**(1):131-144 (2017).
68. Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J*. **21**(11):2642-54 (2007).
69. Nennig SE, Schank JR. The Role of NFκB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol*. **52**(2):172-179 (2017).
70. Yoon YK, Woo HJ, Kim Y. Orostachys japonicus Inhibits Expression of the TLR4, NOD2, iNOS, and COX-2 Genes in LPS-Stimulated Human PMA-Differentiated THP-1 Cells by Inhibiting NF-κB and MAPK Activation. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2015**:682019 (2015).
71. Wang J, Chen H, Cao P, Wu X, Zang F, Shi L, Liang L, Yuan W. Inflammatory cytokines induce caveolin-1/β-catenin signalling in rat nucleus pulposus cell apoptosis through the p38 MAPK pathway. *Cell Prolif*. **49**(3):362-72 (2016).
72. Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radic Biol Med*. **91**:154-63 (2016).
73. Rodríguez AM, Delpino MV, Miraglia MC, Costa Franco MM, Barrionuevo P, Dennis VA, Oliveira SC, Giambartolomei GH. Brucella abortus-activated microglia induce neuronal death through primary phagocytosis. *Glia*. **65**(7):1137-1151 (2017).
74. Calvello R, Cianciulli A, Nicolardi G, De Nuccio F, Giannotti L, Salvatore R, Porro C, Trotta T, Panaro MA, Lofrumento DD. Vitamin D Treatment Attenuates Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration in an Animal Model of Parkinson's Disease, Shifting M1 to M2 Microglia Responses. *J Neuroimmune Pharmacol*. **12**(2):327-339 (2017).

75. Boneva NB, Kikuchi M, Minabe Y, Yamashima T. Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: implication of fatty acid-binding proteins (FABP) and G protein-coupled receptor 40 (GPR40) in adult neurogenesis. *J Pharmacol Sci.* **116**(2):163-72 (2011).
76. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR- γ -dependent mechanism. *Kidney Int.* **67**(3):867-74 (2005).
77. Cseh B, Doma E, Baccarini M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett.* **588**(15):2398-406 (2014).
78. Chen H, Shao X, Li L, Zheng C, Xu X, Hong X, Li X, Wu M. Electroacupuncture serum inhibits TNF- α -mediated chondrocyte inflammation via the Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* **16**(5):5807-5814 (2017).
79. Shin WS, Hong Y, Lee HW, Lee ST. Catalytically defective receptor protein tyrosine kinase PTK7 enhances invasive phenotype by inducing MMP-9 through activation of AP-1 and NF- κ B in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget.* **7**(45):73242-73256 (2016).
80. El Haj M. Memory suppression in Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* **37**(3):337-43 (2016).
81. Kirova AM, Bays RB, Lagalwar S. Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2015:748212 (2015).
82. Whitehead A, Perdomo C, Pratt RD, Birks J, Wilcock GK, Evans JG. Donepezil for the symptomatic treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Int J Geriatr Psychiatry.* **19**(7):624-33 (2004).
83. Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Study Group. *BMJ.* **321**(7274):1445-9 (2000).
84. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging.* **3**(2):211-25 (2008).
85. Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **10**(4):e0123289 (2015).
86. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* **537**(7618):50-6 (2016).
87. Chai X, Wu S, Murray TK, Kinley R, Cella CV, Sims H, Buckner N, Hanmer J, Davies P, O'Neill MJ, Hutton ML, Citron M. Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *J Biol Chem.* **286**(39):34457-67 (2011).

88. Liu W, Zhao L, Blackman B, Parmar M, Wong MY, Woo T, Yu F, Chiuchiolo MJ, Sondhi D, Kaminsky SM, Crystal RG, Paul SM. Vectored Intracerebral Immunization with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Tau Transgenic Mice. *J Neurosci.* **36**(49):12425-12435 (2016).
89. Freund Levi Y, Vedin I, Cederholm T, Basun H, Faxén Irving G, Eriksson M, Hjorth E, Schultzberg M, Vessby B, Wahlund LO, Salem N Jr, Palmblad J. Transfer of omega-3 fatty acids across the blood-brain barrier after dietary supplementation with a docosahexaenoic acid-rich omega-3 fatty acid preparation in patients with Alzheimer's disease: the OmegAD study. *J Intern Med.* **275**(4):428-36 (2014).
90. Pan Y, Scanlon MJ, Owada Y, Yamamoto Y, Porter CJ, Nicolazzo JA. Fatty Acid-Binding Protein 5 Facilitates the Blood-Brain Barrier Transport of Docosahexaenoic Acid. *Mol Pharm.* **12**(12):4375-85 (2015).
91. Pan Y, Morris ER, Scanlon MJ, Marriott PJ, Porter CJH, Nicolazzo JA. Dietary docosahexaenoic acid supplementation enhances expression of fatty acid-binding protein 5 at the blood-brain barrier and brain docosahexaenoic acid levels. *J Neurochem.* **146**(2):186-197 (2018).
92. Ramírez E, Mendieta L, Flores G, Limón ID. Neurogenesis and morphological-neural alterations closely related to amyloid β -peptide (25-35)-induced memory impairment in male rats. *Neuropeptides.* **67**:9-19 (2018).
93. Unger MS, Marschallinger J, Kaindl J, Höfling C, Rossner S, Heneka MT, Van der Linden A, Aigner L. Early Changes in Hippocampal Neurogenesis in Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* **53**(8):5796-806 (2016).
94. Valero J, España J, Parra-Damas A, Martín E, Rodríguez-Álvarez J, Saura CA. Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP(Sw,Ind) transgenic mice. *PLoS One.* **6**(2):e16832 (2011).
95. Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, Kinoshita A, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M. DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep.* **4**:7130 (2014).
96. Zhou MM, Ding L, Wen M, Che HX, Huang JQ, Zhang TT, Xue CH, Mao XZ, Wang YM. Mechanisms of DHA-enriched phospholipids in improving cognitive deficits in aged SAMP8 mice with high-fat diet. *J Nutr Biochem.* **59**:64-75 (2018).
97. Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci.* **29**(28):9078-89 (2009).
98. Borre YE, Panagaki T, Koelink PJ, Morgan ME, Hendriksen H, Garssen J, Kraneveld AD, Olivier B, Oosting RS. Neuroprotective and cognitive enhancing effects of a multi-targeted food intervention in an animal model of neurodegeneration and depression. *Neuropharmacology.* **79**:738-49 (2014).
99. Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS One.* **6**(2):e17397 (2011).

100. Hooijmans CR, Van der Zee CE, Dederen PJ, Brouwer KM, Reijmer YD, van Groen T, Broersen LM, Lütjohann D, Heerschap A, Kiliaan AJ. DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Dis.* **33**(3):482-98 (2009).
101. Belayev L, Hong SH, Menghani H, Marcell SJ, Obenaus A, Freitas RS, Khoutorova L, Balaszczuk V, Jun B, Oriá RB, Bazan NG. Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood-Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection, and Neurobehavioral Recovery After Experimental Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* **55**(8):7090-7106 (2018).

