

博 士 論 文

有機カチオン膜輸送体による  
神経分化とミクログリア活性化の制御

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻  
分子薬物治療学研究室

学籍番号 1429012001

学生氏名 石本尚大

主任指導教員 加藤 将夫 教授

論文提出 平成 30 年 1 月

# 目次

第一章 序論	-2-
第二章 膜輸送体 OCTN1 による神経幹細胞の分化制御	
第一節 緒言	-6-
第二節 方法	-8-
第三節 結果	-15-
第四節 考察	-39-
第三章 膜輸送体 OCTN1 によるミクログリアの活性化制御	
第一節 緒言	-46-
第二節 方法	-48-
第三節 結果	-56-
第四節 考察	-68-
第四章 結論	-73-
引用文献	-74-
謝辞	-91-
参考文献	-92-

## Abbreviations

BCRP	breast cancer resistance protein
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum albumin
bFGF	basic fibroblast growth factor
bHLH	basic helix-loop-helix
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DG	dentate gyrus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM/F12	DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERGO	ergothioneine
FBS	fetal bovine serum
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLT-1	glutamate transporter 1
GLUT5	glucose transporter 5
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
Math1	atonal homolog 1
LPS	lipopolysaccharide
MDR1	multiple drug resistance 1
MRP	multidrug resistance-associated Protein
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NOX	NADPH oxidase
NSCs	neural stem cells
NGF	nerve growth factor
NT3	neurotrophin 3
NT5	neurotrophin 4/5
OCTN1	carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4
<i>octn1</i> <sup>-/-</sup>	<i>octn1</i> -deficient
PA	paraformaldehyde
PBS	phosphate-buffered saline
P19-NSCs	P19 cells differentiated into neural stem-like cells
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
S.E.M.	standard error of the mean
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
siRNA	small interfering RNA
SIRT	sirtuin
SLC	solute carrier
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
Trk	tropomyosin receptor kinase
WT	wild-type
36B4	acidic ribosomal phosphoprotein P0
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

## 第一章 序論

脳の恒常性の維持には、脳を構成する神経細胞や神経幹細胞（NSCs）、アストロサイト、ミクログリア等、各々の細胞が正常に機能することや、細胞内外における神経伝達物質や神経栄養因子、サイトカイン、栄養素、代謝物等の濃度を適切に維持することが重要である [1-7]。一方、脳内の恒常性の破綻は、種々の精神神経疾患の発症・増悪につながる [8, 9]。したがって、疾患時の脳内の恒常性の破綻を改善することは精神神経疾患の治療に有効と考えられる。特に、脳内の恒常性維持において、神経細胞を新たに生み出す NSCs や脳の免疫・炎症に関与するミクログリアの役割が重要である。下記がその例である。

NSCs は、自己複製能及び神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を有する [10, 11]。哺乳動物において、神経細胞は一度損傷を受けると再生することはできないが [12, 13]、NSCs が新たに神経細胞を生み出すこと（神経新生）により神経細胞を補い、脳内の神経細胞数の恒常性は保たれる [14-16]。そのため、神経新生は、記憶や運動、感情等の基本的な脳機能の維持に重要である [16-17]。一方、神経新生の抑制は、種々の精神神経疾患の発症や増悪に関与する [17-19]。神経新生は、環境の変化に伴うストレスや、大うつ病、認知症等の種々の精神神経疾患により抑制される [17-19]。そこで、海馬の神経新生の抑制を改善すると、うつ様症状は改善され [20-21]、また、高齢に伴う学習能力や記憶力の低下が緩和される [22]。臨床使用されている抗うつ薬の場合も、海馬の神経新生の促進が抗うつ効果の発現に必要となることが分かっている [23-25]。したがって、大うつ病等の精神神経疾患において、海馬の神経新生を促進することは、有効な治療戦略となり得る [26-28]。

脳内に存在する免疫細胞のミクログリアもまた、脳の恒常性の維持に関与する [29, 30]。ミクログリアは、正常な脳内では、枝分かれした突起を伸ばした静止型として存在し、突起を張り

巡らせることで周囲の神経細胞に異常が無いかを監視している [31]。脳の損傷や、ウイルスの感染等の異常に反応するとアメーバ状に肥大化し活性化型となる。活性化型ミクログリアは異常部位へ遊走されると、免疫反応として、tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) や interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等の炎症性サイトカインや活性酸素種 (ROS)、神経栄養因子の産生・放出や、不要な細胞やタンパク質の貪食を担い、神経細胞を保護する [32-34]。一方で、ミクログリアが異常に活性化すると、損傷部位等以外の周囲の正常な神経細胞等にも傷害を与え、慢性的な神経損傷はアルツハイマー病や大うつ病等の精神神経疾患の発症・増悪に関与する [35-37]。したがって、ミクログリアの活性化を適切に調節することができれば、種々の精神神経疾患の根本的な治療につながるかもしれない。

以上より、NSCs の神経新生及びミクログリアの免疫機能を制御することは、種々の精神神経疾患治療につながる可能性があり有意義である。本研究では、以上の NSCs 及びミクログリアの機能制御の標的として膜輸送体の可能性を考えた。膜受容体の場合は、一過性の速い細胞内シグナル伝達の活性化を特徴とするが、一方で、膜輸送体は膜内外での基質の濃度差を調節するため、膜受容体よりも長期的な細胞機能調節に優れると考えられる。特に、慢性化する種々の精神神経疾患においては、膜輸送体を介した NSCs やミクログリアの長期的な機能調節が有効かもしれない。さらには、仮に、NSCs 及びミクログリア両細胞に共通して発現する膜輸送体があり、その輸送体の機能を調節することで、両細胞の機能を同時に制御できれば、相乗的な治療効果も期待できる。そこで、我々は、有機カチオン膜輸送体 OCTN1/SLC22A4 に着目した。NSCs において、OCTN1 の発現は他の有機カチオン膜輸送体の発現と比較して顕著に高い [38]。また、*octn1* 遺伝子欠損マウスの胎児脳において、ミクログリアマーカーである CD11b mRNA の発現は、野生型マウスと比較して有意に低い。さらに、末梢の免疫細胞のマクロファージにおいて OCTN1 の発現が確認されてい

るため [39]、脳免疫細胞のミクログリアにおいても発現している可能性がある。したがって、OCTN1 の制御により、NSCs あるいはミクログリアの機能を制御できる可能性を考えた。OCTN1 は脳、小腸、肝臓、腎臓など体内に幅広く発現しており、幅広い有機カチオン性化合物を基質として認識し細胞内に取り込む活性がある [40]。特に生体内においては食餌由来の抗酸化作用を有するアミノ酸 ergothioneine (ERGO) の消化管吸収、臓器分布、尿細管再吸収、脳移行等に関与する [41-43]。近年では、マウスへの ERGO の経口投与が、OCTN1 を介して効率良く脳内に分布し、海馬歯状回 (DG) における神経新生促進及び抗うつ薬様作用を発揮することを報告した [43]。さらには、パーキンソン病や認知症の患者において、ERGO の血中濃度が健常人と比較し有意に低いことが分かっており、血中 ERGO 濃度の低下が精神神経疾患の増悪に関与することが示唆されている [44, 45]。NSCs 及びミクログリアにおける OCTN1 を介した ERGO の輸送が精神神経疾患の病態に関与するのかもしれない。

脳内の神経系細胞における OCTN1 の生理的な機能も少しずつ報告が増えてきている。神経細胞においては、OCTN1 の基質である ERGO は、N-methyl-D-aspartate や  $\beta$ -amyloid による細胞毒性から保護する [46, 47]。NSCs においては、OCTN1 を介した ERGO の取り込みが、抗酸化作用により増殖を抑制し、一方、抗酸化作用以外の作用により、神経細胞への分化（神経分化）を促進する [38]。しかしながら、ERGO による神経分化促進の詳細なメカニズムは未だ不明である。その未知の作用の解明は、神経新生が病態に関与する大うつ病等、種々の精神神経疾患の治療の新たな標的や経路の発見につながる可能性があり有意義である。さらには、ERGO のパーキンソン病等の精神神経疾患の増悪への関与も報告があるため [44-46]、ERGO の作用機序の解明は、種々の精神神経疾患の病態の解明にもつながるのかもしれない。そこで、本論文の第二章では、NSCs における

ERGO の神経分化促進のメカニズム解析を行った。

一方、ミクログリアにおけるOCTN1の発現は確認されていない。末梢の免疫細胞においては、CD14陽性細胞 [47]やlamina propria mononuclear cells [39]などにOCTN1は発現する。さらに、マクロファージ株化細胞のTHP-1及び、線維芽細胞様滑膜細胞のMH7Aにおいては、それぞれLPS、TNF $\alpha$ の刺激によって、OCTN1のmRNA量に増加がみられ [39, 48]、また、小腸炎症部位におけるOCTN1のタンパク発現量は、対照群と比較して有意な高値を示した [39]。したがって、脳の免疫細胞であるミクログリアにもOCTN1が発現しており、ミクログリアの活性化制御に関与する可能性がある。ミクログリアは活性化時に多量のROSを産生するが、ROSはサイトカインの産生に関与する。実際、抗酸化物質edaravoneの添加は、サイトカインの産生を抑制する [49]。したがって、OCTN1は良好な基質である抗酸化物質ERGOを取り込むことにより、ミクログリアの活性化を制御する可能性が考えられる。第三章では、ミクログリアにおけるOCTN1の機能的な発現及び、OCTN1やその基質ERGOのミクログリア活性化への関与を検討した。

## 第二章 膜輸送体 OCTN1 による神経幹細胞の分化制御

### 第一節 緒言

NSCsは自己複製能及び神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を有する [10, 11]。哺乳動物成体において、神経細胞は一度損傷を受けると再生することはできないが [12, 13]、NSCsが新たに神経細胞を生み出すことにより神経細胞を補い、脳内の神経細胞数の恒常性は保たれる [14-16]。そのため、神経新生は、記憶や運動、感情などの脳機能の維持に極めて重要である [16, 17]。一方、神経新生の抑制は、種々の精神神経疾患の発症や増悪に関与する [17-19]。神経新生は、環境の変化に伴うストレスや、大うつ病、認知症等の種々の精神神経疾患により抑制される [17-19]。そこで、海馬の神経新生の抑制を改善すると、うつ様症状は改善され [20-21]、また、高齢に伴う学習能力や記憶力の低下が緩和される [22]。さらには、海馬神経新生の促進は、既存の抗うつ薬の効果の発現に必要である [23-25]。したがって、大うつ病等の精神神経疾患において、海馬の神経新生を促進することは、有効な治療戦略となり得る [26-28]。

本研究では、NSCsの神経新生制御の標的として膜輸送体の可能性を考えた。膜受容体の場合は、一過性の速い細胞内シグナル伝達の活性化を特徴とするが、一方で、膜輸送体は膜内外での基質の濃度差を調節するため、膜受容体よりも長期的な細胞機能調節に優れると考えられる。特に、精神神経疾患等の慢性疾患においては、NSCsの機能を長期的に調節する必要があるため、膜輸送体を介した細胞の長期的な機能調節が有効かもしれない。そこで、我々は、有機カチオン膜輸送体 OCTN1/SLC22A4 に着目した。OCTN1は脳、小腸、肝臓、腎臓など体内に幅広く発現している。脳内においては神経細胞、NSCsにおいても発現が確認されており [38, 42]、特に NSCsにおいて、OCTN1の発現は他の有機カチオン膜輸送体の発現と比較して顕著に高い [38]。OCTN1は、幅広い



有機カチオン性化合物を基質として認識し細胞内に取り込む活性がある [40]。特に生体内においては食餌由来の抗酸化作用を有するアミノ酸 ERGO の消化管吸収、臓器分布、尿細管再吸収、脳移行等に関与する [41-43]。近年では、マウスに対する ERGO の経口投与が、OCTN1 を介して効率良く脳内に分布し、DG における神経新生促進及び抗うつ薬様作用を発揮することを報告した [43]。また、マウスにおける ERGO の記憶力向上効果が報告されている [50]。さらには、パーキンソン病や認知症の患者において、ERGO の血中濃度が健常人と比較し有意に低いことが分かっており、血中 ERGO 濃度の低下が精神神経疾患の増悪に関与することが示唆されている [44, 45]。以上より、OCTN1 を介した ERGO の輸送が NSCs の神経新生を制御することで、大うつ病等の精神神経疾患に関与する可能性が考えられる。さらには、培養 NSCs を用いた *in vitro* 研究では、OCTN1 を介した ERGO の細胞内への取り込みが ERGO の抗酸化作用以外の作用によって、bHLH 型転写制御因子 atonal homolog 1 (Math1) の誘導を介して神経分化を促進することを明らかにした [38]。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だ不明である。その ERGO の新規作用の解明は、神経新生が病態に関与する大うつ病等の種々の精神神経疾患の長期治療や予防の新たな標的や経路の発見につながる可能性があり有意義である。そこで本研究では、NSCs における ERGO による神経分化促進作用のメカニズム解明に取り組んだ。

NSCs の分化は、神経伝達物質やキナーゼ、転写制御因子、神経栄養因子等、細胞内外の様々な要因により制御される [51, 52]。特に、神経栄養因子の brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、ERGO のように Math1 の誘導を介して NSCs の神経分化を促進し [38, 53]、抗うつ効果にも関与する [24]。神経栄養因子には、nerve growth factor (NGF)、BDNF、neurotrophin 3 (NT3)、neurotrophin 4/5 (NT5) があり、tropomyosin receptor kinase A, B, C (TrkA, TrkB, TrkC) や p75 neurotrophin receptor

の活性化を介して、神経分化能を含めた多様な NSCs の機能制御に関わる [53]。そこで、培養 NSCs に対する ERGO の曝露が、すべての神経栄養因子、NGF、BDNF、NT3、NT5 の発現に及ぼす影響について検討した。さらに、ERGO はアミノ酸であるため、アミノ酸センサーとして知られる mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) にも着目した。mTORC1 は、細胞内アミノ酸等を感知することで、翻訳やオートファジーを制御し、細胞の増殖や成長等を制御する [54, 55]。近年、mTORC1 が BDNF の分泌を促進することや [59]、神経分化を制御することも報告されている [56, 59]。そこで、ERGO による NSCs の神経分化促進のメカニズムとして、特に、神経栄養因子シグナル及び mTORC1 シグナルを介するかどうかを検討した。

## 第二節 方法

### 2-2-1) 試薬

Anti-mTOR、p-mTOR (Ser2448)、S6K1、p-S6K1 (Thr371)、p-S6K1 (Thr389)、4EBP1、p-4EBP1 (Thr37/46)、TrkB antibody、anti-rabbit IgG antibody conjugated with peroxidase は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より、anti-p-TrkB (Tyr816) antibody は、Merck Millipore (Darmstadt, Germany) より、Block Ace は、DS Pharma Biomedical (Suita, Japan) より、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)、poly-L-lysine (m. w. 150,000-300,000)、anti-βIII-tubulin、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、fetal bovine serum は、Biowest (Nuaille, France) より、GNF5837 は、Synkinase Pty (Melbourne, Australia) より、ISOGEN は、Nippon Gene (Tokyo, Japan) より、MultiScribe™ Reverse Transcriptase は、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) より、Neuro Cult Chemical Dissociation Kit は、Stem Cell Technologies Inc. (Cambridge, UK) よ

り、Neurotrophin 4/5、BDNF Rapid™ ELISA Kitは、Biosensis (Thebarton, SA, Australia)より、rapamycinは、Adipogen Life Sciences (San Diego, CA, USA)より、recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF)、recombinant human epidermal growth factor (EGF)は、Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA)より、recombinant mouse neurotrophin 4/5は、Genscript (Piscataway, NJ, USA)より、secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor seriesは、Invitrogen (San Diego, CA, USA)より、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、Can Get Signalは、TOYOBO (Osaka, Japan)より購入した。上記以外の試薬はすべて市販試薬特級を用いた。

### 2-2-2) 動物

ICRマウスは、Japan SLC (Hamamatsu, Japan)より購入した。5週齢のオスマウスを実験に用いた。動物はすべて標準食で適切な温度、明るさの環境において飼育され、水及び食餌は自由摂取とした。*octn1*遺伝子欠損 (*octn1*<sup>-/-</sup>) マウスは、C57BL/6J野生型 (WT) マウスとのバッククロスを6回行ったマウスを実験に用いた [38, 41]。WTマウス及び*octn1*<sup>-/-</sup>マウスは、金沢大学学際科学実験センター・実験動物研究施設で繁殖、飼育されたものを用いた。生後3-4週目に離乳し、離乳後のマウスはすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由に与えられた。動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

### 2-2-3) 初代培養神経幹細胞の培養

初代培養神経幹細胞 (培養NSCs) の調製は、過去の論文を参考にして行った [38]。妊娠15日齢のマウスから、胎児を取り出し、NSCsを豊富に含む胎児大脳皮質を単離しメスで細断した。

0.25%のトリプシンと28 mMのグルコースを含むPBSに浸し、37 °Cで、20分間インキュベートした。

組織をピペッティングによりばらばらにほぐし、0.2%のアガロースをコーティングした6 well dishに $5 \times 10^5$  cells/mLの細胞密度で播種し、浮遊条件下で培養した。最初の6日間は、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、100  $\mu$ g/mL apo-transferrin、20 nM progesterone、5.2 ng/mL sodium selenite、60  $\mu$ M putrescine、10 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGFを含有するDMEM/F12の培地で、37 °C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて培養を行った。培養3日目に、培地を半量換え、アガロースをコーティングしていない6 well dishに撒きなおした。NSCsは自己複製能を有するため、細胞塊を形成し、その大きさは培養日数依存的に増加していく。6日目に、Neuro Cult Chemical Dissociation Kit (Stem Cell Technologies Inc., Cambridge, UK) により、NSCsの細胞塊を分散させ、実験に応じて、6 wellまたは24 well dishに $1 \times 10^5$  cells/mLで撒きなおし、3日おきの半量メディウム換えを行いながら、3または6、9日間、浮遊条件下で培養し、各実験に使用した。この培養期間において、必要に応じERGOや各種阻害剤を添加した。ERGOの添加濃度は、先行研究より神経新生促進効果が確認されている500  $\mu$ Mと設定した [38]。

NSCsの分化誘導は、以下のプロトコルに従って行った。得られたNSCsを、Neuro Cult Chemical Dissociation Kitにより分散し、あらかじめpoly-L-lysineがコーティングされた4 well dishに、 $3 \times 10^5$  cells/mLの細胞密度で撒き、接着培養を行い、神経細胞、アストロサイトへ分化誘導をかけた。培養3日目に、メディウム交換を行った。分化誘導時の培地は、5% FBS、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、28 mM glucose、2 mM glutamine、5 mM HEPES、25  $\mu$ g/mL apo-transferrin、250 ng/mL insulin、0.5 pM  $\beta$ -estradiol、1.5 nM triiodothyronine、10 nM progesterone、4 ng/mL sodium selenite、50  $\mu$ M putrescineを添加したDMEMを用いた。培養3日目に各実験に用いた。培養3日目において、NSCs

マーカーのnestinが消失し、未成熟神経細胞マーカーの $\beta$ III-tubulin及びアストロサイトマーカーのGFAPが増加する [38]。

#### 2-2-4) Western blotting

Western blot は、過去の論文を参考に行った [38]。サンプルは、氷冷した PBS によって 2 回洗浄し、4 °C、5 分、15,000 g の条件で遠心し沈殿させた。得られたペレットは、1 mM EDTA、1 mM EGTA、protease inhibitors (0.1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride、1  $\mu$ g/mL leupeptin、1  $\mu$ g/mL antipain、0.5 mM benzamidine hydrochloride hydrate)、phosphatase inhibitors (10 mM sodium fluoride、10 mM  $\beta$ -glycerophosphate disodium salt hydrate、10 mM sodium pyrophosphate decahydrate、1 mM sodium orthovanadate)を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)中において、tip sonicator (TOMY SEIKO Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて可溶化し、Bio-rad Protein Assay Kit によりタンパク量を測定した。さらに、各サンプルに 10% glycerol、2% sodium dodecylsulfate、0.01% bromophenol blue、5% mercaptoethanol を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8)を最終濃度 20%となるように加えタンパクを変性させた。10%ポリアクリルアミドゲルの各ウェルに 5  $\mu$ g/8  $\mu$ L アプライし、compact-slab size PAGE system (ATTO, Tokyo, Japan)により、室温、21 mA/plate の条件下、30 分電気泳動を行った。続いて、100%のメタノールに 30 秒浸した PVDF 膜にブロッキングを行った。4% Block Ace 溶液によるブロッキング後、PVDF 膜は、各抗体、抗 mTOR、S6K1、eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1)、p-mTOR、p-S6K1 (Thr371 及び Thr389)、p-4EBP1 (Thr37/46)、TrkB と p-TrkB、 $\beta$ -actin 抗体を Can Get Signal の buffer A によって 1000 倍希釈したものと 4 °C で一晩反応させた。続いて、それぞれ、HRP 標識抗マウス IgG 抗体希釈溶液 (1/10000 with Can Get Signal buffer B)、また

は、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体希釈溶液 (1/2000 with Can Get Signal buffer B) と室温で一時間反応させた。これらの抗体と反応させたタンパクは、ECL™ 試薬によって発色させ lumino image analyzer (LAS-4000; FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて検出した。解析の際は、バンドの濃さを ImageJ software を用いて測定した。

### 2-2-5) 定量RT-PCR

Total RNAの抽出は、ISOGENの標準プロトコル通りに行った。オリゴプライマー、dNTP mix、RT buffer、MultiScribe™ Reverse TranscriptaseによりcDNAを合成した。cDNAは、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、sense primer、antisense primer (Table 1) と混ぜ、Mx3005P (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA)により、増幅した。PCRの反応条件は以下の通り。95 °C、15分 → (95 °C、10秒 → 60 °C、30秒) x 40 cycles。mRNA量は、相対定量の $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量した。相対定量では、ハウスキーピング遺伝子であるacidic ribosomal phosphoprotein P0 (36B4)によって、サンプル間のテンプレート量及び逆転写効率の補正を行った。

**Table 1. Primers used for real-time PCR analysis in the present study**

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (3'-5')
NGF	TCTATACTGGCCGAGTGAG	GGACATTGCTATCTGTGTACGG
BDNF	GCGGCAGATAAAAAGACTGC	TCAGTTGGCCTTTGGATAACC
NT3	GGAGGAAACGCTATGCAGAA	GTCACCCACAGGCTCTCACT
NT5	CCCAAGTTGAGGGAAAACAA	TCCTCCGGGAGAACTCCTAT
bFGF	CGGCTCTACTGCAAGAACG	TGCTTGGAGTTGTAGTTTGACG
EGF	CCATCCATTGGCAAACACC	AACCTTCACGACACAAACACC
vEGF	AAAAACGAAAGCGCAAGAAA	TTTCTCCGCTCTGAACAAGG

CNTF	CTGGAACAGAAGGTCCCTGA	AAGCCCCACAGCTTCTTCTC
Haptoglobin	GAGAGGTCCACGATGAGAGC	ACTCCACAGCAAAAAGCTGAC
SCF	CAGAACAGCTAAACGGAGTCCG	TTTGTGTCTTCTTCATAAGGAAAGG
Math1	ACATCTCCCAGATCCCACAG	GGGCATTTGGTTGTCTCAGT
36B4	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT

## 2-2-6) 酵素免疫測定法

酵素免疫測定は、Neurotrophin 4/5 Rapid™ ELISA Kit及びBDNF Rapid™ ELISA Kitを用いて、添付の推奨プロトコルに準じて行った。サンプルは、氷冷したPBSによって2回洗浄し、4 °C、5分、15,000 gの条件で遠心し沈殿させた。得られたペレットに対して、protease inhibitors (0.1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL antipain, 0.5 mM benzamidine hydrochloride hydrate)、phosphatase inhibitors (10 mM sodium furoride, 10 mM β-glycerophosphate disodium salt hydrate, 10 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 1 mM sodium orthovanadate)を含む蒸留水をペレットの体積の約9倍となるように添加して、tip sonicator (TOMY SEIKO Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用して可溶化した。Bio-Rad Protein Assay Kitによってタンパク定量を行い、各ELISAキットを用いて、Neurotrophin 4/5及びBDNFを定量した。吸光度は、microplate reader (MOLECULAR DEVICES, Sunnyvale, CA, USA)により、450 nmの波長を測定した。定量した値は、各サンプルのタンパク量により補正した。

## 2-2-7) 免疫染色

0.75 cm×0.75 cmにカバーガラス (Matsunami Glass Ind.,Ltd., Oosaka, Japan)を切断し、それを70% EtOHに10秒程度浸した後、紫外線照射を両面3分間ずつ行い、細胞を接着させる面を火で4

秒間程度あぶったものを入れた24 well dishにPBSで希釈した75 µg/mL poly-L-lysineを加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、少なくとも2時間静置した。Poly-L-lysine溶液を除去しPBSで3回洗浄した後、PBSをよく取り除き、乾燥させ、細胞を播種し培養した。細胞を、PBSで2回洗浄し、4%のparaformaldehyde (PA) により、室温、20分インキュベートすることで固定化した。さらに、3% bovine serum albumin、0.2% Triton X-100を含むPBSに室温、30分間インキュベートし、ブロッキングを行った。抗βIII-tubulin、GFAP抗体を、ブロッキング液を10倍希釈した溶液により、各1/1000で希釈し、4 °Cで一晩反応させた。PBSによって、3回洗浄し、Alexa Fluor seriesによって標識された二次抗体を、ブロッキング液を10倍希釈した溶液により1000倍に希釈し、室温で1時間反応させた。二次抗体反応を終えた細胞は、PBSにより3回洗浄を行い、DAPI封入剤を添加し、周りをマニキュアで密封し、室温、遮光条件下で乾燥させた。観察は、共焦点顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて行った。

神経分化能の評価においては、未成熟な神経細胞のマーカーであるβIII-tubulin陽性細胞は緑色に染色し、アストロサイトのマーカーであるGFAP陽性細胞は、赤色に染色した。全細胞数であるDAPI陽性細胞数に占める各陽性細胞数の割合を計算した。

#### 2-2-8) マウスへのERGOの経口投与

5週齢のICRマウスに対して、0または50 mg/kgのERGOを、2週間あるいは2日間、隔日経口投与を行った。2週間投与されたマウスは最終投与の5日目に、2日間投与されたマウスは最終投与の4時間後において、大脳皮質及びDGを単離した。組織の重量を測定し、Western blot及び酵素免疫測定法を行った。



## 2-2-9) 統計解析

すべての実験は少なくとも3回繰り返して行われた。データは平均値±標準誤差で表記し、Microsoft ExcelでStudentのt検定、one-way ANOVA with the Bonferroni/Dunnあるいは、Dunnett testを適用し、統計学的に解析した。p値が0.05未満を統計学的に有意差ありとした。

## 第三節 結果

### 2-3-1) 培養NSCsにおけるOCTN1を介したERGOの取り込みは神経分化を促進する。

我々は過去に、マウス由来のNSCs様細胞であるP19-NSCsにおいて、small interfering RNA (siRNA)導入によるOCTN1発現抑制実験を行うことで、OCTN1を介したERGOの細胞内への取り込みが神経分化を促進することを証明した [38]。しかし、初代培養NSCsにおいては、ERGOの神経分化促進にOCTN1が関与することは確認できていない。そこで、野生型マウス由来の初代培養NSCs (WT-NSCs) 及びERGOの輸送活性がほとんどない*octn1*遺伝子欠損マウス由来のNSCs (*octn1*<sup>-/-</sup> NSCs) において [38]、ERGOの神経分化への影響を調べた。初代培養NSCsを、ERGO (500 μM)存在下または非存在下で9日間培養し、さらに3日間接着培養により神経細胞及びグリア細胞に分化誘導をかけ、免疫染色により神経分化を評価した。未成熟な神経細胞のマーカーであるβIII-tubulin陽性細胞は緑色に、アストロサイトのマーカーであるGFAP陽性細胞は赤色に染色した (Fig. 1A, B)。WT-NSCsへのERGOの曝露は、非曝露群と比較して、βIII-tubulin陽性細胞数が多いように見えたが (Fig. 1A)、一方で、*octn1*<sup>-/-</sup>-NSCsに対するERGOの曝露はその数に変化はないようであった (Fig. 1B)。

ImageJを用いた定量解析によると、WT-NSCsにおいては、ERGO曝露群は対照群と比較して、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞の割合は有意に増加し、GFAP陽性細胞の割合は有意に減少した (Fig. 1C)。一方で、*octn1*<sup>-/-</sup>-NSCsにおいては、ERGO曝露は、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞及びGFAP陽性細胞の割合に影響しなかった (Fig. 1D)。また、OCTN1を介したERGOの取り込みがNSCsの増殖へ及ぼす影響を調べるためにNSCsが形成する細胞塊の面積を測定した。WT-NSCsにおいては、ERGO (500  $\mu$ M)曝露群は、対照群と比較して、細胞塊面積が有意に減少したが、*octn1*<sup>-/-</sup>-NSCsにおいては、ERGO曝露は細胞塊面積に影響を及ぼさなかった (Supplementary Fig. S1A, B)。これらの結果は、NSCsにおいて、OCTN1を介した細胞内へのERGOの取り込みが、神経分化を促進し、増殖を抑制することを示唆し、過去のP19-NSCsを使用したOCTN1発現抑制実験の結果と対応する [38]。

### 2-3-2) ERGOの神経分化促進作用はNSCsの培養期間及び曝露時間に依存する。

続いて、ERGOの神経分化促進効果とNSCsの培養日数との関係をICRマウス由来のNSCs (ICR-NSCs) を用いて調べた。培養NSCsの性質は、培養期間によって変化する。一般に、培養NSCsの神経分化能は培養日数が長くなるほど、低下する [60]。Fig. 2B, Cの○は、ERGO非存在下において、培養日数3、6、9日目のNSCsの神経分化能及びグリア細胞への分化能を示しているが、培養日数が増加するにつれて、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞への分化能は減少し (Fig. 2B)、GFAP陽性細胞への分化能は増加した (Fig. 2C)。一方で、グラフの●、●はそれぞれ、ERGO (500  $\mu$ M)を培養の最後の1日間あるいは3日間曝露した群である。3日間培養したICR-NSCsに対して、ERGOを培養最後の1日間あるいは3日間曝露すると、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞は増加傾向が見られ (Fig. 2B)、一方で、GFAP陽性細胞は減少傾向が確認できた (Fig. 2C)。6あるいは9日間培養したICR-NSCsに対して、ERGOを培養

最後の1日間あるいは3日間曝露すると、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞は有意に増加し、一方で、GFAP陽性細胞は有意に減少した (Fig. 2B, C)。この結果より、培養3日目より6日目あるいは9日目のICR-NSCsの方が、ERGOの神経分化促進作用が大きいことが示唆された。6日目及び9日目のICR-NSCsのOCTN1の発現が、3日目の発現よりも高いことが関係している可能性がある [38]。胎児期のNSCsよりも成体に近いNSCsの方が、ERGOの神経分化促進作用が大きいのかもかもしれない。この実験より、培養6日目のNSCsにおいて、ERGOの神経分化促進作用が最も大きかったため (Fig. 2B, C)、以後の長期曝露実験 (Fig. 3A, Supplementary Fig. S2)を除く *in vitro* 実験では、培養6日目のICR-NSCsを使用した。

### 2-3-3) ERGOは神経栄養因子NT5を誘導し、神経分化能を上昇させる。

ERGOによる神経分化促進のメカニズムとして、神経栄養因子の誘導に着目した。神経栄養因子のBDNFは、ERGOと同様にbHLH型の転写制御因子Math1を誘導することで神経分化を促進する [38, 53]。まず、NSCsに対するERGOの長期間曝露が種々の栄養因子のmRNA発現に及ぼす影響を確認した。WT-NSCsに対してERGOを9日間曝露すると、Math1とNT5の発現は有意に増加したが (Fig. 3A)、一方、*octn1*<sup>-/-</sup>-NSCsにおいては、ERGOはMath1や成長因子の発現には影響を及ぼさなかった (Data not shown)。また、ICR-NSCsに対するERGOの9日間の曝露も、Math1及びNT5のmRNA発現を顕著に増加させた (Supplementary Fig. S2)。ICR-NSCsは、WT-NSCsと比較して、コストに対する細胞回収量が多いため、以後の実験ではICR-NSCsを用いた。ERGOによる神経栄養因子の発現への関与を短時間で評価すると、ERGO添加後12時間でNT5のmRNA発現を有意に増加させ、24時間後にMath1のmRNA発現を有意に増加させ (Fig. 3B)、ERGO曝露1日後に分化誘導をかけ免疫染色によって神経分化能を評価すると、未成熟神経細胞マーカー $\beta$ III-tubulinの陽性細胞が有意に増加し

た (Fig. 2B、○及び●)。さらには、酵素免疫検定法の結果、ERGO曝露後24時間において、細胞内NT5のタンパク量が有意に増加したが (Fig. 3C)、BDNFの発現には変化がなかった。これらの結果は、ERGOがNT5の発現誘導を介してNSCsの神経分化を促進する可能性を示すため、以降の実験で検証する。

#### 2-3-4) ERGOはTrkBの活性化を介して、神経分化を促進する。

次に、ERGOによる神経分化促進が、NT5の受容体であるTrkBの阻害剤GNF5837によって抑制されることを確かめた。培養6日目のICR-NSCsは、培養の後半3日間において、ERGO (500  $\mu$ M)存在下あるいは非存在下、阻害剤GNF5837 (100 nM) 存在下あるいは非存在下において培養を行い、免疫染色により神経分化能を評価した。GNF5837は、ERGOによる $\beta$ III-tubulin陽性細胞の割合の増加を有意に抑え、GFAP陽性細胞の割合の減少を有意に抑制した (Fig. 4A-C)。一方、GNF5827単独投与は、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞、GFAP陽性細胞の割合に影響を及ぼさなかった (Fig. 4A-C)。ERGOと同様に、GNF5837によるNT5の神経分化促進作用への影響についても検討した (Fig. 4A, B)。NT5 (100 ng/mL)の添加は、 $\beta$ III-tubulin陽性細胞の割合を増加させ、GNF5837はNT5による $\beta$ III-tubulin陽性細胞の割合の増加を有意に抑えた一方、GFAP陽性細胞の割合の減少を有意に抑制した (Fig. 4A-C)。さらには、GNF5837は、ERGOによるMath1 mRNAの発現誘導を有意に抑制した (Fig. 4D)。また、3日間のERGO曝露はTrkBのリン酸化を有意に増加させたが、そのTrkBリン酸化の増加は、GNF5837により有意に抑制された (Fig. S3A, B)。これらの結果は、ERGOがNSCsにおいて、少なくとも一部、NT5の発現誘導を介したTrkBの活性化によって神経分化を促進することを示唆した。

### 2-3-5) ERGO は NSCs において mTORC1 シグナルを活性化する。

続いて、どのようにERGOがNT5を誘導するのかを検討した。ERGOはアミノ酸であるため、アミノ酸センサーとして知られるmTORC1シグナルに着目した。mTORC1シグナルは、神経栄養因子BDNFを誘導する [59,61]。まず、mTORC1の上流であるmTORのリン酸化、下流のS6K1、4EBP1のリン酸化へのERGOの影響について検討した。NSCsに対するERGOの3日間の曝露はp-mTOR、p-S6K1 (Thr389)、p-S6K1 (Thr371)の発現を有意に増加させたが、mTORC1阻害剤のrapamycin (100 nM)の同時添加はERGOによるmTOR、S6K1のリン酸化を有意に減少させた (Fig. 5A, B)。一方で、ERGOは、mTOR及びS6K1の総発現量に影響を及ぼさなかった (Fig. 5A, C)。また、ERGOは、4EBP1及びp-4EBP1の発現にも影響しなかった (Fig. 5A-C)。齧歯類では、4EBP1には、3つのアイソフォームが存在する。 $\gamma$ は高リン酸化型、 $\beta$ は中間型であり、 $\alpha$ は低リン酸化型である [62]。ラパマイシンは、 $\beta$ 及び $\gamma$ 型のp-4EBP1を有意に減少させ、 $\alpha$ 型のp-4EBP1は増加傾向が見られた (Fig. 5B)。この結果は、過去のBerettaやLin等の報告と一致する [62, 63]。次に、ERGO曝露によるmTORC1シグナル関連タンパクのリン酸化を経時的に評価した。ERGO添加後1時間で、p-S6K1 (Thr389)の発現は有意に増加し、p-mTORの発現はERGO添加後6時間で有意に増加した (Fig. 5D, E)。NT5の発現はERGO添加後12時間で誘導された (Fig. 3B)。このように、mTORC1シグナルの活性化はNT5の発現誘導より、早い時間で観察された。興味深いことに、mTORのリン酸化は、その下流にあるとされるS6K1 (Thr389)のリン酸化よりも遅かった。このことに関しては、考察の章で議論する。一方、 $\beta$ 及び $\gamma$ 型のp-4EBP1の発現は増加傾向にあった (Fig. 5D, E)。以上の結果は、NSCsにおいてERGOがmTORC1シグナルを活性化することを示唆する。

### 2-3-6) ERGO は mTORC1 シグナルを介した TrkB の活性化によって神経新生を促進する。

次に、ERGO による NSCs の神経分化促進において mTORC1 シグナルの活性化が関与するかどうかを、種々の mTORC1 シグナルの阻害剤を用いて検討した。Rapamycin は mTORC1 の阻害剤で、GSK2334470 は S6K1 の上流の一つである PDK1 の阻害剤、PF4708671 は S6K1 の阻害剤である。

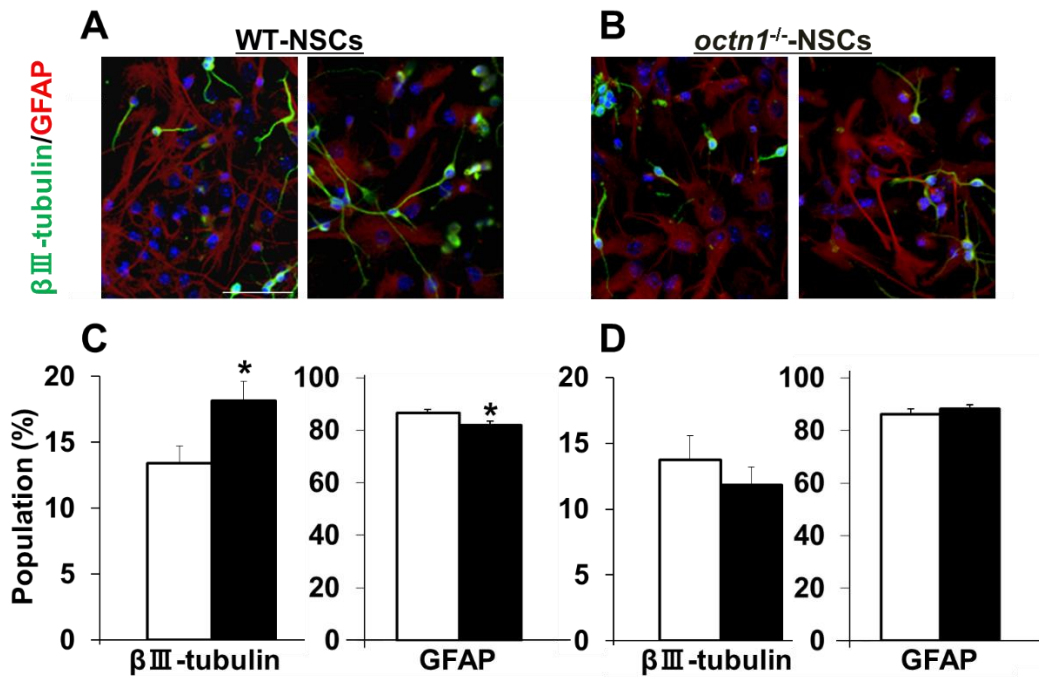
培養 6 日目の ICR-NSCs は、培養の後半 3 日間において、ERGO (500  $\mu$ M) 存在下あるいは非存在下、それぞれの阻害剤の存在下あるいは非存在下において培養を行い、免疫染色により神経分化能を評価した。Rapamycin (100 nM)、GSK2334470 (5  $\mu$ M)、PF4708671 (1  $\mu$ M)は、ERGO による  $\beta$ III-tubulin 陽性細胞の増加及び GFAP 陽性細胞の減少を有意に抑制した (Fig. 6A-C)。以上より、ERGO による神経分化促進作用において、S6K1 の活性化が必要であることが示唆された。また、PDK1 の阻害剤の GSK2334470 は、自発的な神経分化も抑制する傾向が確認された (Fig. 6B)。この理由に関しては、PDK1 は S6K1 だけでなく神経分化に重要な Akt シグナルの活性化にも関与するため、GSK2334470 により Akt シグナルが抑制された可能性がある [64]。さらには、ERGO による p-S6K1 の活性化と p-TrkB の活性化との関連性について、mTORC1 阻害剤や S6K1 阻害剤、PDK1 阻害剤を用いて検討した。ERGO は、p-TrkB 及び p-S6K1 の発現量を有意に増加させたが、total-TrkB、total-S6K1 の発現量には影響しなかった (Fig. 6D, E)。PDK1 阻害剤の GSK2334470 (5  $\mu$ M)及び S6K1 阻害剤の PF4708671 (1  $\mu$ M)は、ERGO による TrkB、S6K1 のリン酸化を有意に抑制した (Fig. 6D, E)。

mTORC1 阻害剤の Rapamycin (100 nM)は、ERGO による S6K1 のリン酸化を顕著に抑制し、TrkB のリン酸化は抑制傾向が見られた (Fig. 6D, E)。以上より、ERGO は、S6K1 (Thr389)のリン酸化を介して、TrkB を活性化し、NSCs の神経分化を促進することが示唆された。

### 2-3-7 ERGO の経口投与は海馬歯状回の S6K1 (Thr389)及び NT5/TrkB を活性化する。

*in vivo* において、ERGO による mTORC1 及び NT5/TrkB シグナルの活性化について検討した。5 週齢の ICR マウスに対して 50 mg/kg ERGO を 2 週間隔日経口投与すると、投与後 19 日後に DG における p-TrkB、p-S6K1 (Thr389)の発現を有意に増加させたが (Fig. 7A, C)、大脳皮質においては変化が見られなかった (Fig. 7B, D)。また、ERGO の経口投与は、DG における NT5 のタンパク量を有意に増加させたが (Fig. 7E)、大脳皮質においては変化は認められなかった (Fig. 7E)。DG には NSCs が豊富に含まれ、NSCs は OCTN1 の発現が高いため [38]、DG に多くの ERGO が分布することが、mTORC1 や TrkB の活性化、NT5 の発現量の増加に関わると推察される。また、培養 NSCs と NSCs を多く含む DG において、NT5 の発現を比較すると、培養 NSCs の方が、DG よりも高かった (Fig. 3C, 7E)。NSCs の密度が高くなる程、NT5 量が多くなり、また、ERGO の作用も大きくなるのかもしれない。一方、5 週齢の ICR マウスに対して 50 mg/kg ERGO を 2 日間の短期間において隔日経口投与すると、DG の p-S6K1 (Thr389)の発現量は有意に増加したが、p-TrkB の発現量は変化しなかった (Fig. S4A, B)。この結果より、ERGO による TrkB の活性化は、S6K1 (Thr389)の活性化よりも下流にあると考えられる。以上のように、ERGO が p-S6K1 (Thr389)及び NT5/TrkB シグナルを活性化する点で、*in vivo* の結果及び *in vitro* の結果は対応した。

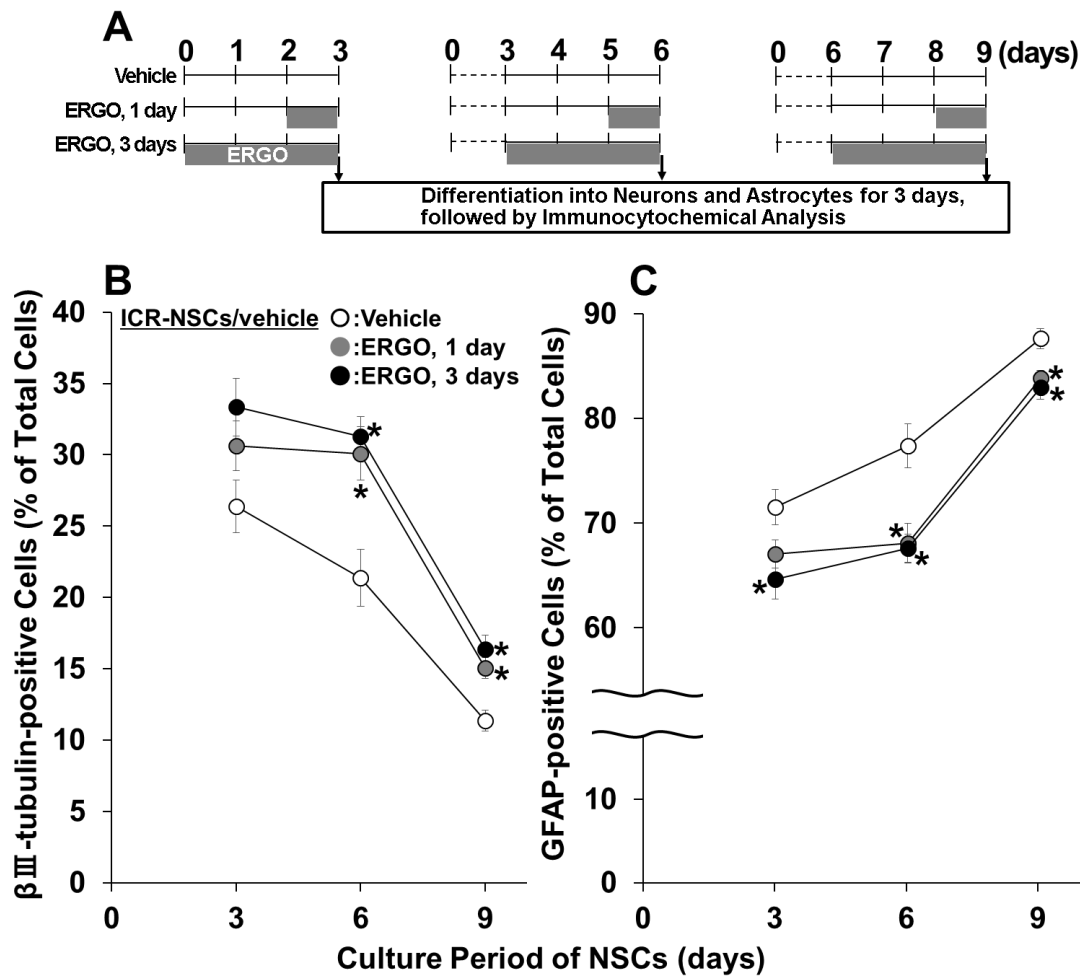
## Figure legends



**Figure 1. Comparison of effect of ERGO on neuronal differentiation between cultured WT- and *octn1*<sup>-/-</sup>-NSCs.**

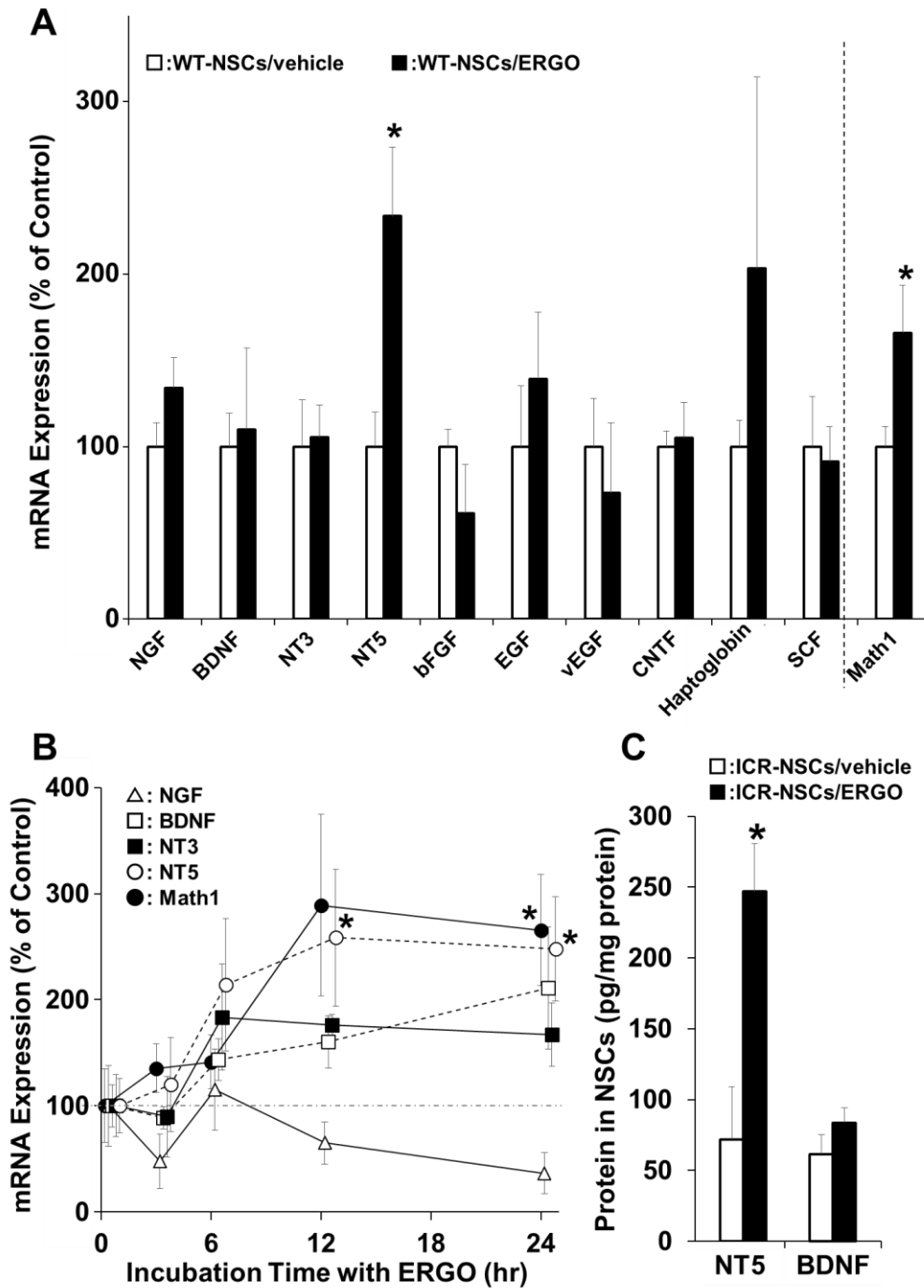
(A, B) Effect of ERGO on neuronal differentiation in WT- and *octn1*<sup>-/-</sup>-NSCs derived from C57BL/6J embryonic murine cortex. NSCs were exposed to vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) for 9 days and then induced to differentiate by adhesion culture for further 3 days. The cells were fixed with 4% PA, followed by immunocytochemical detection of immature neuronal marker  $\beta$ III-tubulin (green), astroglial marker GFAP (red), and nuclear marker DAPI (blue). *Scale bar*: 50  $\mu$ m. (C, D) The number of cells positive for each marker was counted by using ImageJ and normalized by the number of DAPI-positive cells. White columns show results of NSCs treated with vehicle, and black columns show that of NSCs treated with ERGO. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*P < 0.05, significant difference from the value obtained from WT-NSCs treated with vehicle.





**Figure 2. Culture period- and exposure time-dependent efficacy of ERGO in ICR-NSCs.**

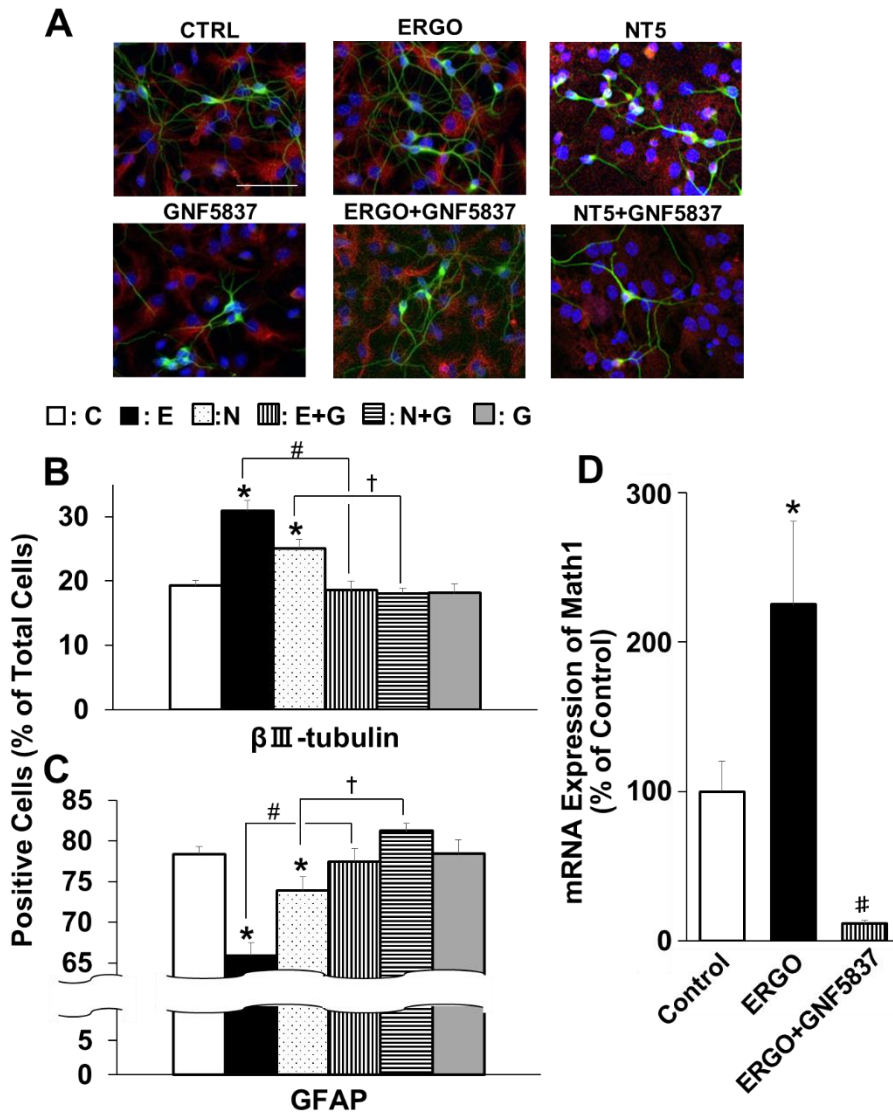
(A) Schematic representation of experimental schedule. NSCs were cultured for up to 3, 6, or 9 days, and the cells were exposed to 500  $\mu$ M ERGO during the last 0 (white symbols), 1 (gray symbols), or 3 days (black symbols) in the each culture, followed by evaluation of neuronal differentiation. In brief, NSCs were induced to differentiate by adhesion culture for further 3 days. The cells were fixed with 4% PA, followed by immunocytochemical detection of immature neuronal marker  $\beta$ III-tubulin (green), astroglial marker GFAP (red), and nuclear marker DAPI (blue). The number of cells positive for each marker was counted by using ImageJ and normalized by the number of DAPI-positive cells (B, C). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 8). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value obtained from ICR-NSCs/vehicle.



**Figure 3. Effect of ERGO on expression of several trophic factors in cultured NSCs.**

(A) WT-NSCs were exposed to vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) for 9 days and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis. mRNA expression of several trophic factors were examined. Each value is normalized by the expression level of 36B4 mRNA and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-6). \*P < 0.05, significant difference from the value obtained from WT-NSCs/vehicle. (B) ICR-NSCs were cultured for up to

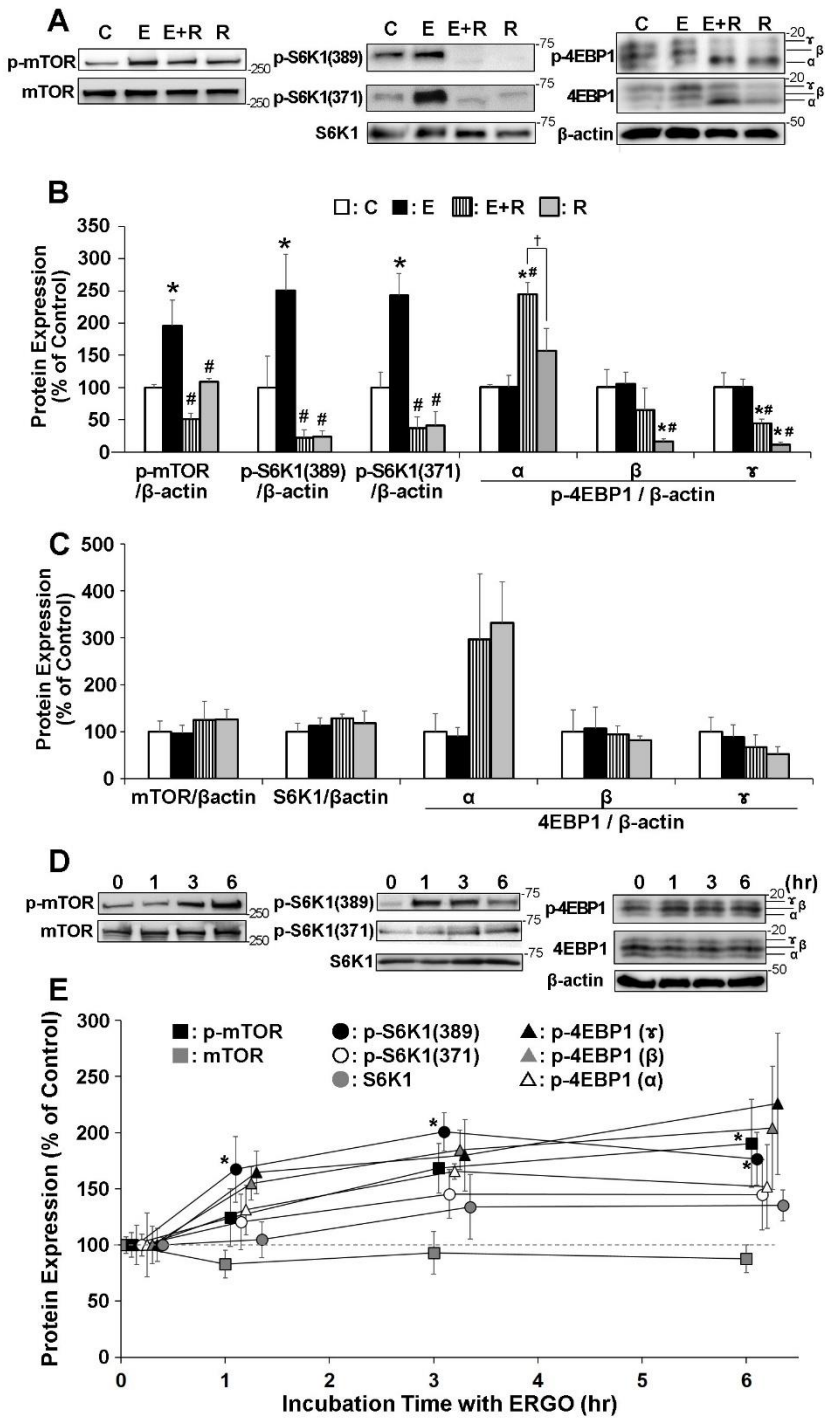
6 days, and during the last 0, 3, 6, 12, or 24 h in the culture, the cells were exposed to vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis. mRNA expression of NGF, BDNF, NT3, NT5, and Math1 were examined ( $\triangle$ : NGF,  $\square$ : BDNF,  $\blacksquare$ : NT3,  $\circ$ : NT5,  $\bullet$ : Math1). Each value is normalized by the expression level of 36B4 mRNA and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4-6). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value at 0 h. (C) ICR-NSCs were cultured for up to 6 days, and the cells were exposed to vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) during the last 24 h in the culture, and expression of NT5 and BDNF at the protein level were examined by enzyme immunoassay. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-6). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value obtained from ICR-NSCs/vehicle.



**Figure 4. Effect of inhibition of TrkB receptor on ERGO- or NT5-induced neuronal differentiation in ICR-NSCs.**

(A) ICR-NSCs were cultured for up to 6 days, and during the last 3 days of the culture, the cells were incubated with vehicle, ERGO (500  $\mu$ M), or NT5 (100 ng/mL) in either the presence or absence of GNF5837 (100 nM), the inhibitor of TrkB. The NSCs were induced to differentiate by adhesion culture for further 3 days. The cells were fixed with 4% PA, followed by immunocytochemical detection of immature neuronal marker  $\beta$ III-tubulin (green), astroglial marker GFAP (red), and nuclear marker DAPI (blue). *Scale bar*: 50  $\mu$ m. (B, C) The number of cells positive for each marker was counted by using ImageJ and normalized by the number of DAPI-positive

cells. C, E, N, and G mean Control, ERGO, NT5, and GNF5837, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10-20). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value. #P < 0.05, significant difference from the corresponding value of the ERGO-treated group. †P < 0.05, significant difference from the corresponding value of the NT5-treated group. (D) Moreover, expression of Math1 mRNA was examined after incubation of vehicle or ERGO with or without GNF5837 for 3 days. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-6). \*P < 0.05, significant difference from the control value. #P < 0.05, significant difference from the value of the ERGO-treated group.



**Figure 5. Effect of ERGO on mTORC1 signaling in ICR-NSCs.**

(A, B) Phosphorylation of mTORC1 signaling-related proteins (mTOR, S6K1, and 4EBP1) were examined by western blot after incubation with or without ERGO (500  $\mu$ M) and/or rapamycin (100 nM), mTORC1 signaling inhibitor, for 3 days. Fig. 5A shows typical examples of western blot bands. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). \*P < 0.05, significant difference from the

corresponding control value. <sup>#</sup>P < 0.05, significant difference from the corresponding value of the ERGO-treated group. <sup>†</sup>P < 0.05, significant difference between rapamycin-treated group and ERGO and rapamycin-treated group. (A, C) Total protein of mTOR, S6K1, and 4EBP1 were examined by western blot after incubation with or without ERGO and/or rapamycin for 3 days. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). (D, E) ICR-NSCs were cultured for up to 6 days, and the cells were exposed to ERGO (500  $\mu$ M) during the last 0, 1, 3, or 6 h in the culture, and phosphorylation of mTORC1-related proteins (mTOR, S6K1, and 4EBP1) were examined by western blot (■: p-mTOR, ■: mTOR, ●: p-S6K1 (Thr389), ○: p-S6K1 (Thr371), ●: S6K1,  $\triangle$ : p-4EBP1( $\alpha$ ),  $\blacktriangle$ : p-4EBP1( $\beta$ ),  $\blacktriangle$ : p-4EBP1( $\gamma$ )). Fig. 5D shows typical examples of western blot bands. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4-7). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding value at 0 h.

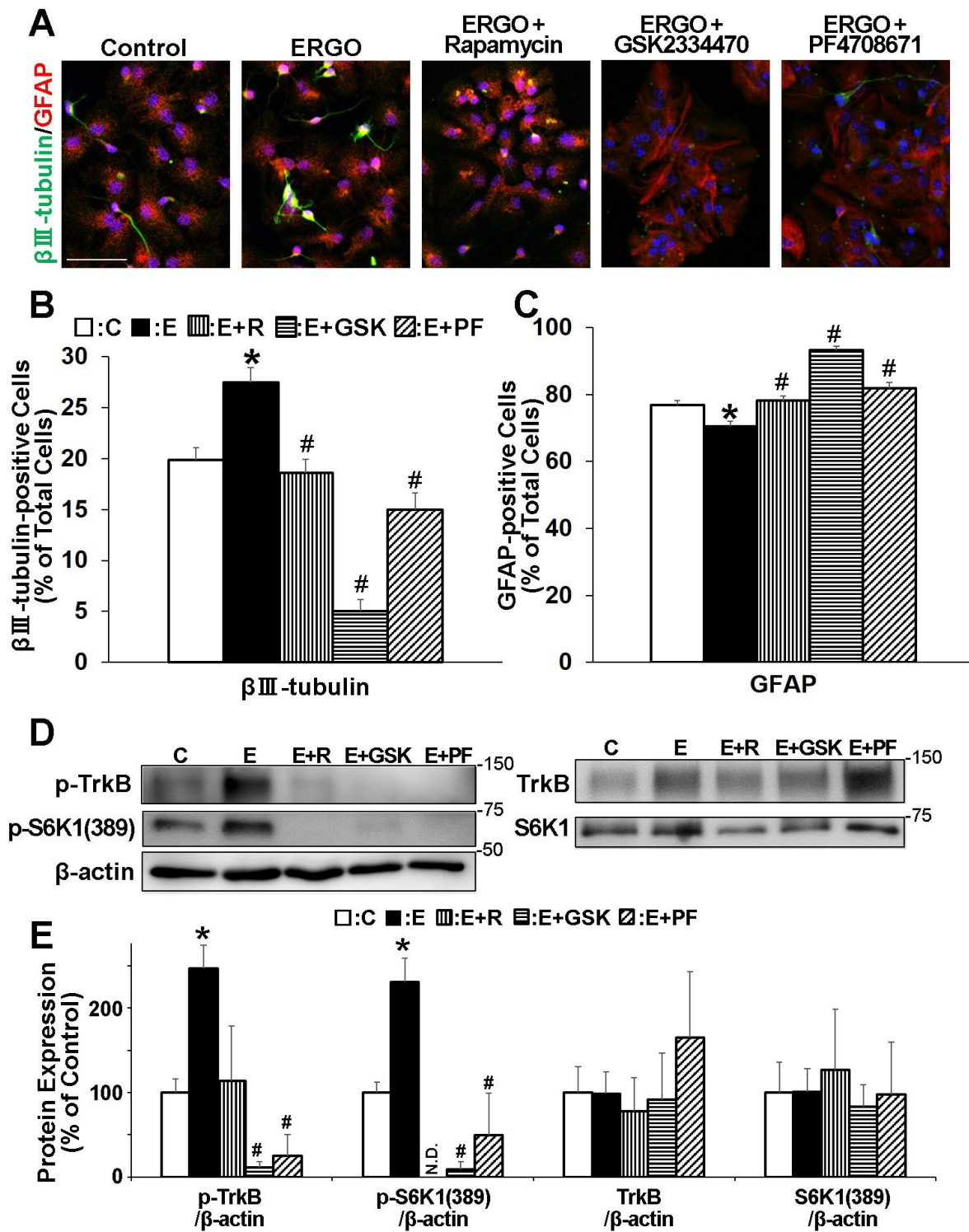
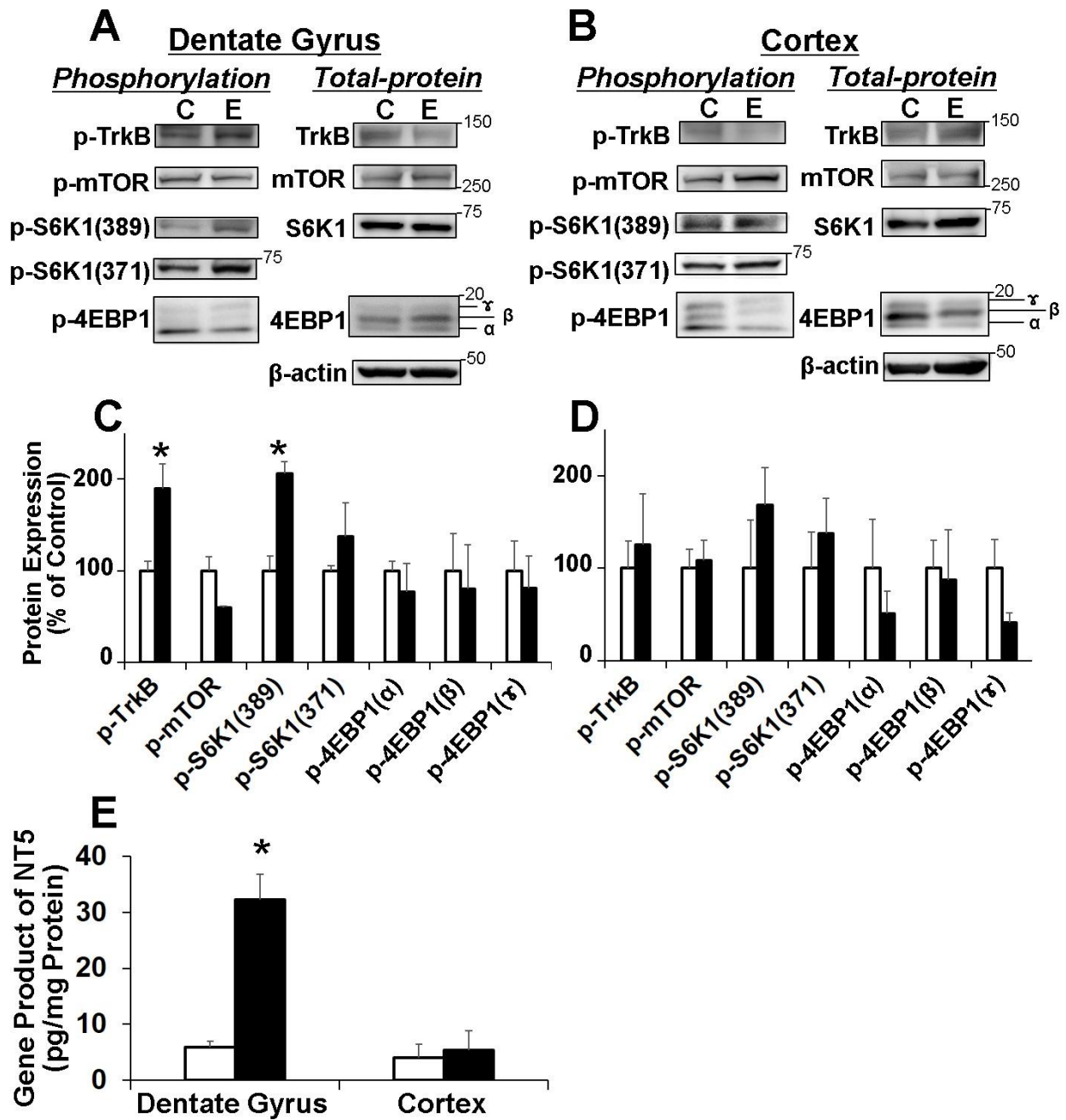


Figure 6. Effect of rapamycin (mTORC1 signaling inhibitor), GSK2334470 (PDK1 inhibitor), and PF4708671 (S6K1 inhibitor) on ERGO-induced neuronal differentiation (A-C) and ERGO-induced phosphorylation of TrkB and S6K1 (D, E) in ICR-NSCs.

(A) ICR-NSCs were cultured for up to 6 days, and during the last 3 days of the culture, the cells were incubated



with vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) in either the presence or absence of rapamycin (100 nM), GSK2334470 (5  $\mu$ M), or PF4708671 (1  $\mu$ M). The NSCs were induced to differentiate by adhesion culture for further 3 days. The cells were fixed with 4% PA, followed by immunocytochemical detection of immature neuronal marker  $\beta$ III-tubulin (green), astroglial marker GFAP (red), and nuclear marker DAPI (blue). *Scale bar*: 50  $\mu$ m. (B, C) The number of cells positive for each marker was counted by using ImageJ and normalized by the number of DAPI-positive cells. C, E, R, GSK, and PF mean Control, ERGO, Rapamycin, GSK2334470, and PF4708671, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10-20). (D, E) Phosphorylation of TrkB and S6K1 were examined by western blot. Fig. 6D shows typical examples of western blot bands. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). *N.D.*: not detectable. \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value. #P < 0.05, significant difference from the corresponding value of the ERGO-treated group.



**Figure 7. Effect of oral administration of ERGO on mTORC1 and NT5/TrkB signaling in DG of hippocampus and cortex in ICR mice.**

(A-E) 5 weeks old ICR mice were administered with 50 mg/kg ERGO on alternative days for 2 weeks. At day 19, DG and cortex were collected, and phosphorylation of TrkB, mTOR, S6K1, and 4EBP1 were examined by western blot (A-D). Amount of gene product of NT5 was also examined by enzyme immunoassay (E). Fig. 7A

and B show typical examples of western blot bands. In the western blot analysis, each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). In the enzyme immunoassay, each value is normalized by the protein concentration and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value.

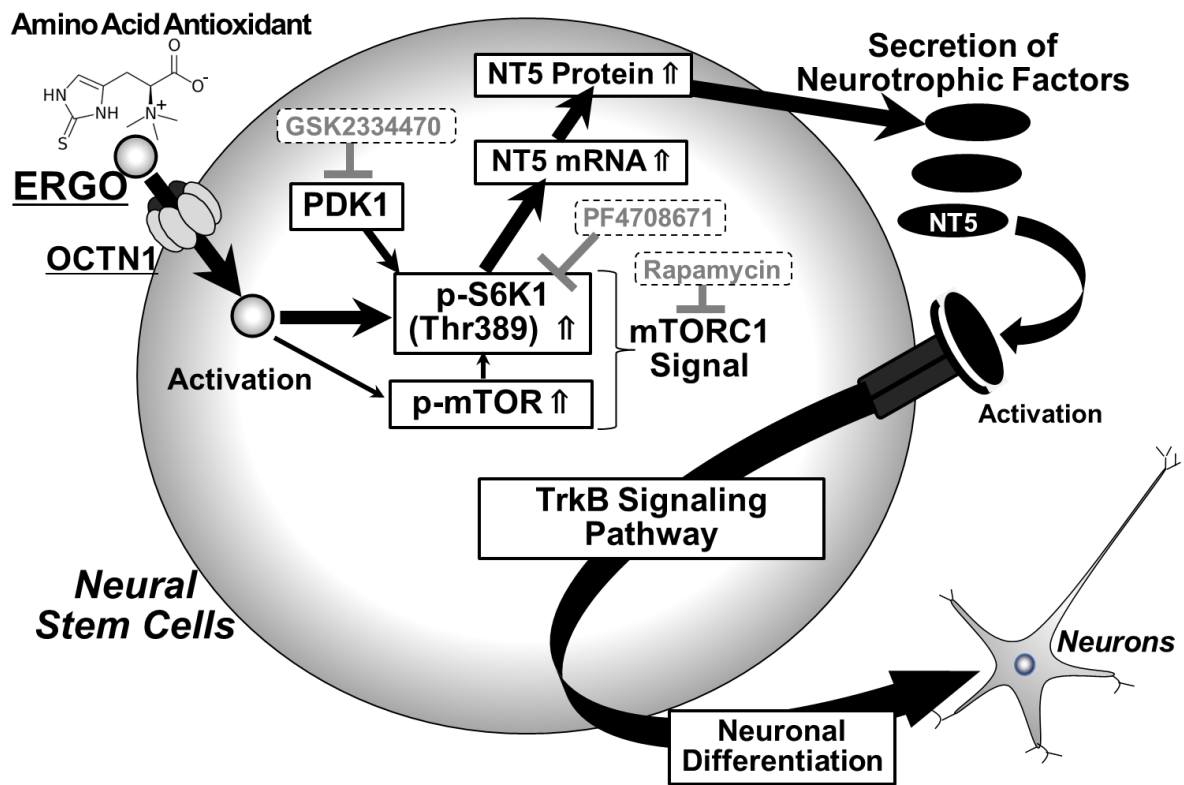
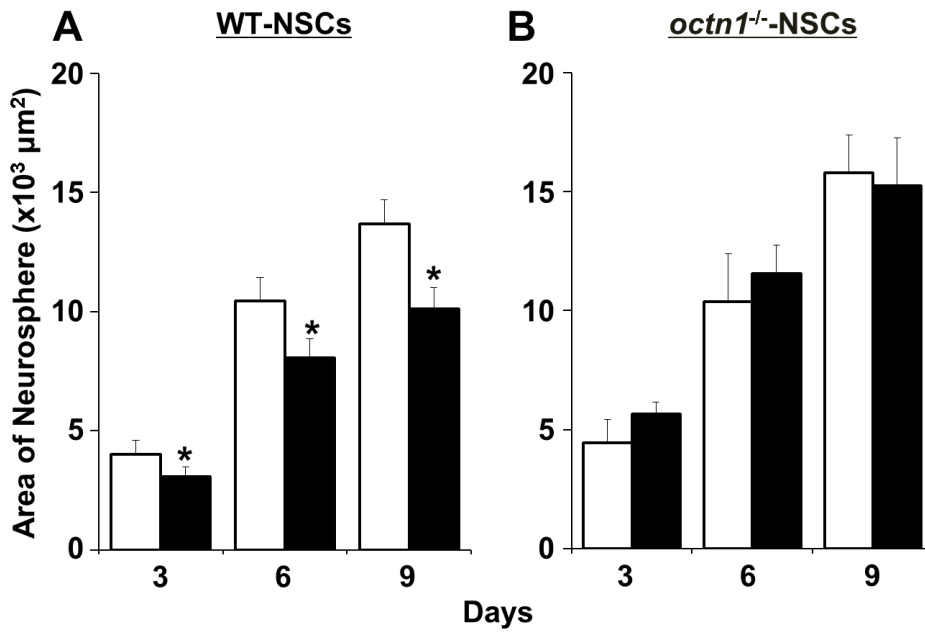


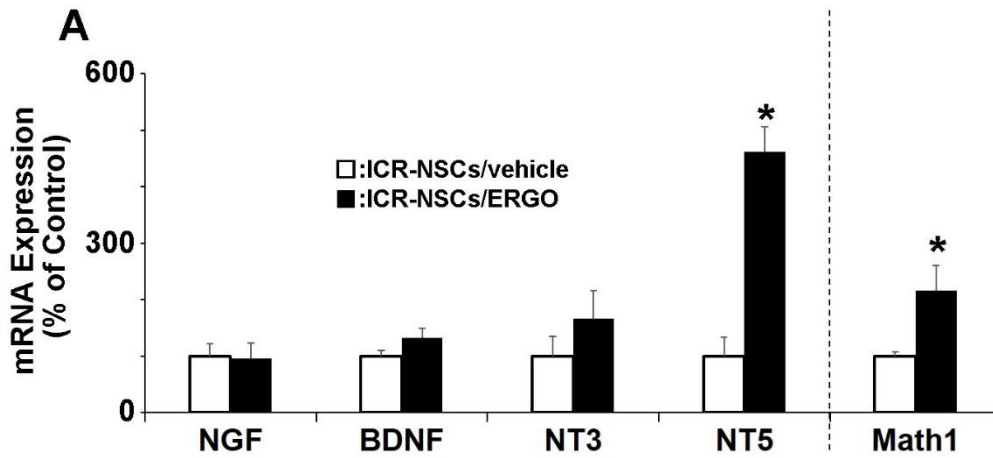
Figure 8. Intracellular ERGO incorporated by OCTN1 promotes neuronal differentiation via activation of S6K1 (Thr389) and NT5/TrkB signaling in NSCs.

Supplementary Figure



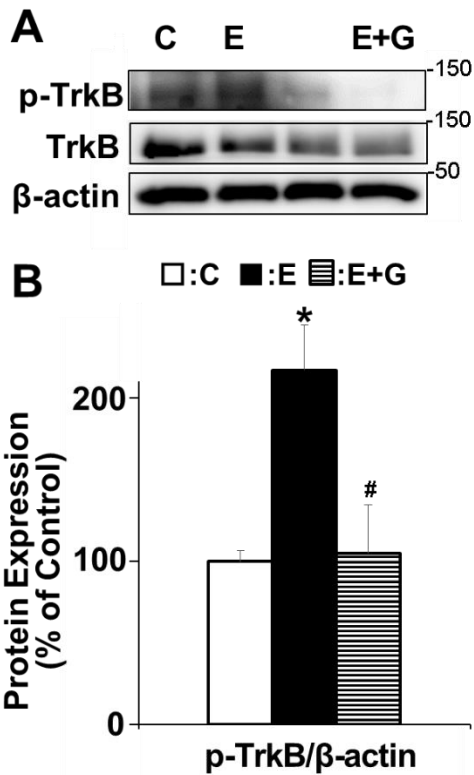
Supplementary Figure S1. Comparison of effect of ERGO on proliferation between cultured WT- and *octn1*<sup>-/-</sup>-NSCs.

(A, B) NSCs were exposed to vehicle or ERGO (500 μM) for 3, 6, or 9 days, and the area of neurospheres was quantified by using ImageJ. Each value represents the mean ± S.E.M. (n = 6). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value obtained from WT-NSCs treated with vehicle.



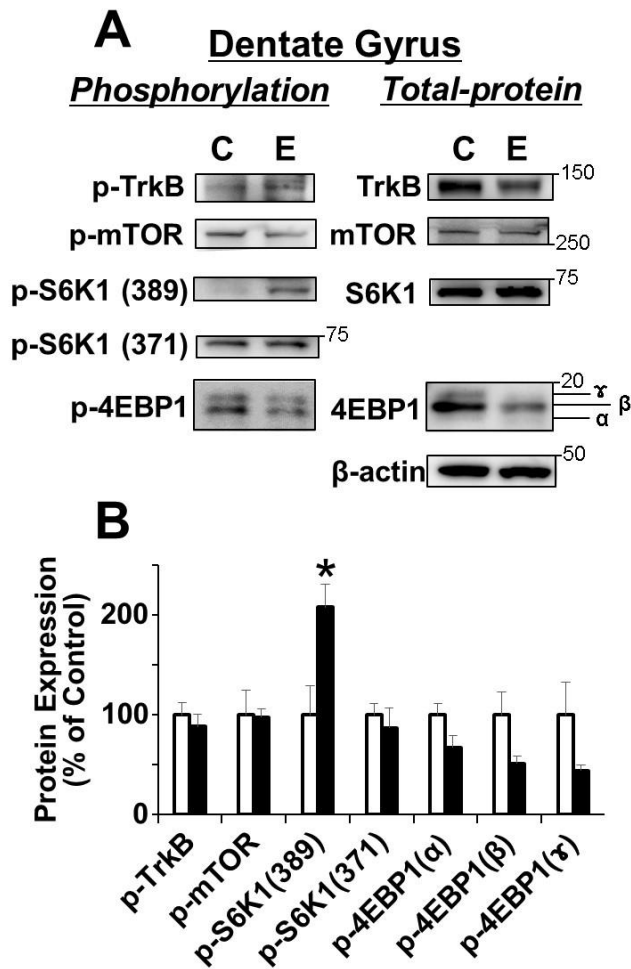
**Supplementary Figure S2. Effect of ERGO on mRNA expression of several neurotrophic factors in ICR-NSCs.**

(A) ICR-NSCs were exposed to vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) for 9 days and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis. mRNA expression of several neurotrophic factors was examined. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-6). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value obtained from ICR-NSCs/vehicle.



**Supplementary Figure S3. Effect of inhibition of TrkB receptor on ERGO-induced phosphorylation of TrkB in ICR-NSCs.**

(A) ICR-NSCs were cultured for up to 6 days, and during the last 3 days of the culture, the cells were incubated with vehicle or ERGO (500  $\mu$ M) in either the presence or absence of GNF5837 (100 nM), the inhibitor of TrkB, followed by examination of phosphorylation of S6K1 and TrkB by western blot. C, E, and G mean Control, ERGO, and GNF5837, respectively. Fig. S3A shows typical examples of western blot bands. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value. #P < 0.05, significant difference from the corresponding value of the ERGO-treated group.



**Supplementary Figure S4. Effect of oral administration of ERGO on mTORC1 signaling and p-TrkB in DG of hippocampus in ICR mice.**

(A, B) 5 weeks old ICR mice were administered with 50 mg/kg ERGO at day 0 and 2. After 4 h from the final administration, phosphorylation of TrkB and mTORC1-related proteins (mTOR, S6K1, and 4EBP1) were examined by western blot. Fig. S4A shows typical examples of western blot bands. Each value was normalized by the protein level of  $\beta$ -actin and represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*P < 0.05, significant difference from the corresponding control value.



## 第四節 考察

### 2-4-1) ERGOによる神経新生促進のメカニズム解明の意義

本研究より、神経幹細胞 (NSCs) において、ERGOはS6K1 (Thr389)及びNT5/TrkBシグナルの活性化を介して、神経分化を促進することが証明された。また、*in vivo*においても、経口投与されたERGOは水溶性でありながら、脳に効率良く移行し、NSCsが豊富に存在するDGのS6K1 (Thr389)及びNT5/TrkBを活性化させた (Fig. 7A, C, E)。mTORC1シグナルの活性化を介してNT5を誘導する例はERGOが初めてである。NT5等の神経栄養因子は14 kDa程のペプチドであり、脳移行性が極めて低く、その末梢投与による種々の精神神経疾患の治療は困難であるが [65]、一方で、脳内に効率良く移行しNT5を誘導するERGOは、精神神経疾患の治療に有用かもしれない。我々の過去の研究によると、ERGOの経口投与がDGの神経新生を促進したが [43]、本研究と合わせて考えると、DGのS6K1 (Thr389)及びNT5/TrkBの活性化が、ERGOの神経新生促進作用のメカニズムとして考えられる。ERGOの作用標的と推察されるS6K1 (Thr389)及びNT5は、既存の精神神経疾患治療薬の標的とは異なるため、既存の治療薬と併用することによる相乗効果が期待できるかもしれない。また、現在のところ、S6K1の活性化やNT5の誘導による有害事象は報告されていないため、S6K1やNT5を標的とした治療は、既存の精神疾患治療薬が有する種々の副作用を回避することが可能かもしれない。今後の検討課題である。

### 2-4-2) ERGOによるS6K1 (Thr389)の優先的な活性化の機序

Fig. 1の結果より、ERGOは、細胞外では作用せず、膜輸送体OCTN1によって取り込まれた後に、細胞内受容体等の活性化を介して神経分化を促進する可能性が考えられた。そこで、アミノ

酸であるERGOの作用標的として、細胞質に存在するアミノ酸センサーmTORC1に着目した。NSCsに対するERGO曝露はmTOR及びその下流のS6K1のリン酸化を有意に増加させ、その増加は、mTORC1の阻害剤rapamycinによって抑制された (Fig. 5A, B)。また、ERGOによるNSCsの神経分化の促進は、rapamycinによって阻害されたことから (Fig. 6A, B)、ERGOは、mTORC1の活性化を介して神経分化を促進すると考えられる。ERGOと同様、第4級アミンを持つL-carnitineもまた、膜輸送体OCTN2を介して細胞内に取り込まれmTORC1シグナルを活性化するため [66]、第4級アミンを有しかつ細胞内に効率良く取り込まれるアミノ酸がmTORC1シグナルの活性化に関わるのかもしれない。興味深いことに、培養NSCsに対するERGO曝露は、他のアミノ酸が存在する通常の培養でも、mTORC1を活性化させた。mTORC1を活性化するものには、分岐鎖アミノ酸のleucine (Leu)、isoleucine (Ile)、valine (Val) 等があるが [67,68]、Leu、Ile、Valの場合、事前にアミノ酸を除かないとmTORC1の活性化は見えない [69]。これは、生体内や培養メディウム中に豊富に存在するLeu、Ile、Val等が、mTORC1活性化の作用点を既に飽和させているためと考えられる。一方、ERGOは、他のアミノ酸が存在する通常の培養条件下でもmTORC1を活性化させたが、これは、ERGOによるmTORC1シグナルの活性化の作用点が、他の分岐鎖アミノ酸等とは異なるためだと考えられる。実際、分岐鎖アミノ酸はmTORのリン酸化後にS6K1をリン酸化するが [70]、ERGOの場合は、最初にS6K1 (Thr389)をリン酸化する (Fig. 5D, E)。したがって、アミノ酸を豊富に含有する生体内においてmTORC1シグナルを活性化させる際には、分岐鎖アミノ酸の投与によりmTORをリン酸化させるより、ERGO投与によりS6K1 (Thr389)を優先的にリン酸化する方が効率的だと考えられる。

面白いことに、ERGOによるmTORC1シグナルの活性化を経時的に評価すると、mTORやS6K1 (Thr371)のリン酸化より下流にあると考えられる [71] S6K1 (Thr389)のリン酸化を短時間で優

先的に増加させた (Fig. 5D, E)。また、マウスに対するERGOの経口投与は、DGにおいて、S6K1 (Thr389)のリン酸化を有意に増加させたが、mTORやS6K1 (Thr371)のリン酸化は増加させなかった (Fig. 7A, C)。mTORC1シグナルのうちS6K1 (Thr389)を優先的に活性化する化合物は現在のところ知られておらず、この結果の解釈は困難であるが、ERGOがmTOR非依存的にS6K1 (Thr389)を活性化の可能性を考えている。例えば、ERGOは、内皮細胞において、sirtuin1 (SIRT1)の発現を増加し [72]、腸幹細胞においては、SIRT1はS6K1 (Thr389)の発現を制御する [73]。また、本研究において、S6K1 (Thr389)のリン酸化を促進するPDK1 [74]の阻害剤でもあるGSK2334470がERGOによるS6K1 (Thr389)のリン酸化を抑制した (Fig. 6D, E)。したがって、ERGOは、SIRT1あるいはPDK1の活性化を介し、S6K1 (Thr389)のリン酸化をmTOR非依存的に促進する可能性がある。より詳細なメカニズムの解明には、さらなる研究が必要である。

さらに興味深いことに、ERGOによるmTORC1シグナルの活性化及び神経分化促進作用は非常に速い。培養NSCsに対するERGOの曝露は、S6K1 (Thr389)をわずか1時間で、mTORを6時間でリン酸化させ (Fig. 5D, E)、24時間でNSCsの神経分化能を上昇させた (Fig. 2B)。これは、細胞外のERGOがOCTN1によって細胞内に効率良く取り込まれ [38]、細胞内ERGO濃度が短時間で上昇することにより、アミノ酸センサーmTORC1が素早く活性化されることに起因するのかもしれない。ERGOと同様に、mTORやS6K1、神経分化を活性化するものに、抗うつ薬のselective serotonin reuptake inhibitors (SSRI)が知られている [75-79]。例えば、SSRIのparoxetineの場合、NSCsの神経分化の促進に7日程 [79]、神経細胞におけるmTOR及びS6K1のリン酸化には4日程度かかる [75]。ERGOと比較すると、paroxetineのmTORC1シグナルの活性化及び神経分化促進作用は非常に遅い。これは、SSRIの場合、シナプス間隙のserotonin量の増加から始まり、serotonin受容体活性化、cAMP/CREB活性化、

BDNF/TrkB活性化、Akt及びERK活性化、mTORC1活性化、神経新生促進という長い過程が必要であるが [58, 80]、ERGOの場合は、mTORC1シグナルの活性化、NT5/TrkBの活性化、神経新生促進と過程が短いからだと考えられる。近年、臨床で問題となる抗うつ薬の効果発現の遅延に、mTORC1の活性化や神経分化促進までに時間がかかることが関与するとの報告がある [23, 59, 76]。一方、mTORC1を短時間で活性化するものにketamineがあるが、即効性の抗うつ効果を示すため近年注目を浴びている [59, 61, 81, 82]。Ketamineは、NSCsにおいて、1時間程度でmTORC1を活性化する [83]。ERGOもまた、NSCsにおいて、短時間でmTORC1シグナル (mTOR, S6K1 (Thr389)) の活性化、神経分化を促進するため、ketamineのように即効性の抗うつ作用を有するかもしれない。さらには、ketamineは麻薬であり依存性の問題があるが [84]、一方で、安全な食用のタモギタケに豊富に含有する水溶性の抗酸化物質ERGOは比較的安全と考えられるため、長期的な治療・予防において有用かもしれない [43]。しかしながら、*in vivo*におけるERGOの即効的な作用については、まだまだデータが少ない。本研究では、ERGOの経口投与後2日及び19日後に、NSCsが豊富に存在するDGにおいてmTORC1下流のS6K1 (Thr389)を活性化させた (Fig. 7, Fig. S4)。また、過去の研究では、2週間のERGOの経口投与は、DGにおいて神経新生を促進し抗うつ薬様作用を示した [43]。今後、ERGOの即効的な作用を確認するために、短期間 (2-14日間) の経口投与実験において、神経新生促進作用、抗うつ効果等を検討していく必要がある。

#### 2-4-3) ERGOによるNT5の選択的な誘導

興味深いことに、培養NSCsに対するERGOの曝露は、神経栄養因子NT5を選択的に誘導した (Fig. 3A-C)。脳において、NT5を誘導する化合物は現在のところERGO以外に報告はないが、BDNF

が誘導される報告はある [59, 85]。例えば、Tetrahydrocannabinolは、マウスの線条体において、mTORC1の活性化を介して、BDNFのmRNA及びタンパクの発現量を増加させる [86]。Creatineは、mTORC1/BDNFシグナルを活性化し、corticosteroneにより誘導されたマウスのうつ様症状を改善する [87]。このようにmTORC1がBDNFを誘導する報告は多くある [59, 85, 88]。本研究においては、ERGOの薬理作用を経時的に評価すると、ERGO曝露後1時間でmTORC1シグナル下流のS6K1 (Thr389)がリン酸化され (Fig. 5D, E)、その後、12時間で神経栄養因子NT5が誘導され (Fig. 3B)、24時間でNSCsの神経分化能が上昇した (Fig. 2B)。また、*in vivo*においても、ERGOの経口投与後、2日でDGのS6K1 (Thr389)のリン酸化が増加し (Fig. S4)、19日後にはS6K1 (Thr389)及びNT5/TrkBシグナルが活性化された (Fig. 7A, C, E)。したがって、ERGOの場合はまず、mTORC1シグナル下流のS6K1 (Thr389)を活性化し、NT5/TrkBシグナルを活性化することで、神経分化を促進する可能性が推察できる。一方、ERGOによるNT5の選択的な誘導の詳細な機序は不明のままである。ERGOによるS6K1 (Thr389)の選択的な活性化が関与するのかもしれない。今後の検討課題である。

近年、NT5の生理的役割についての報告が増えている。NT5は、大うつ病と密接な関係があるBDNFと同じように、TrkBを活性化し神経新生を促進する [23, 53, 89]。臨床では、大うつ病の重症度の上昇に伴い、血漿中BDNF濃度は低下するが [90]、同様に、血漿中NT5濃度も低下するため、NT5もまた大うつ病の重症度のマーカーとして有用と考えられる [91, 92]。したがって、NT5は、BDNFと同様に、TrkBの活性化を介した抗うつ効果に関与すると考えられる。TrkBの活性化は、神経新生やシナプス伝達等を制御することで、うつ症状の改善や、抗うつ薬の感受性の調節にも関与する [93, 94]。また、SSRI等の抗うつ薬の作用には、TrkBシグナルを介した、神経新生促進作用が重要である [23, 25, 94]。そこで近年、TrkBのリガンドであるBDNFを脳内で増加させることにより

大うつ病を治療する試みがなされている。実際、脳室内に注入されたBDNFは、うつ病モデルマウスのうつ症状を改善する [95]。しかしながら、神経栄養因子は、ペプチドであり脳移行性が極めて低い [65]。そのため、神経栄養因子を脳内へ送達させるシステムや、脳移行性が高く脳内で神経栄養因子を誘導する化合物の開発が重要である [96,97]。一方、BDNFのSNPs (Val66Met) を有する大うつ病の場合、抗うつ薬のSSRIの感受性が低いことが分かっている [98, 99]。BDNFのSNPs (Val66Met) ではVal/Valを持つ群と比較して脳内のBDNF分泌機能が低下することが起因すると考えられる [100]。したがって、BDNFのSNPs (Val66Met) を有し、かつ、NT5遺伝子に変異のない大うつ病の場合には、BDNFを誘導するより、正常なNT5を誘導することが、大うつ病治療の新たな戦略となるかもしれない。そこで、ERGOは、経口投与でありながら脳移行性が高く、DGにおいて、BDNFではなくNT5を選択的に誘導するため (Fig. 7E)、BDNF SNPs (Val66Met) を有するSSRIの感受性が低い大うつ病の治療にも有用かもしれない。

#### 2-4-4) 既存の神経新生促進薬との比較

安全な食用のタモギタケに豊富に含まれるERGOは、食餌由来の水溶性の抗酸化物質であり、膜輸送体OCTN1を介して脳に効率良く移行するため、他の既存の神経新生促進薬と比較すると、安全性、脳移行性に関しては、特に優れると考えられる。例えば、既存の抗うつ薬も神経新生促進作用があるが、セロトニン症候群など副作用が多く、その使用の際には注意を要する [101]。一方、ERGOのように食餌由来の化合物で、神経新生を促進するものに、resveratrolやcurcumin等の脂溶性の化合物があるが、バイオアベイラビリティが極めて低く経口投与による摂取は困難である [102]。さらには、受動拡散による非特異的な分布により、予期せぬ副作用が生じる可能性もある。事実、

curcuminの過剰投与や長期的な摂取は肝障害を起こすことが報告されている [103]。一方で、水溶性化合物の場合は、過剰投与したとしても、その吸収は、受動拡散の影響は小さく、膜輸送体により制限され余剰分は排泄されるため、比較的安全と考えられる [104]。例えば、神経新生促進作用を有する緑茶に含有するアミノ酸theanineの長期的な経口投与は [105, 106]、大うつ病患者において、副作用もなく安全にうつ症状を改善する [107, 108]。現在のところ、食餌由来の水溶性化合物の経口投与により神経新生を促進する化合物は、theanineぐらいである。Theanineと同様に、水溶性で、安全な食用のタモギタケに豊富に含まれるERGOの分布は膜輸送体OCTN1によって制限されるため、長期的な投与であっても、比較的安全と考えられる [43]。臨床では、ERGOの血中濃度がパーキンソン病や認知症患者において低下することや [44, 45]、ERGOが学習能力や記憶力の低下を改善することが報告されている [50]。本研究結果と合わせて考えると、ERGOは、S6K1 (Thr389)の活性化、NT5/TrkBの活性化を介した神経分化の促進により、神経変性の進行を調節しているのかもしれない。以上より、ERGOは、脳移行性や安全性の観点からすると、既知の神経新生促進作用を有する化合物中でも特に優れると考えられ、慢性疾患の長期的な治療・予防等に有効と考えられる。

#### 2-4-5) 結論

本研究より、OCTN1によって細胞内に取り込まれたERGOは、S6K1 (Thr389)及びNT5/TrkBシグナルの活性化を介して、NSCsの神経分化を促進することが明らかとなった (Fig. 8)。ERGOが活性化したS6K1 (Thr389)及びNT5は、既存の精神神経疾患治療薬の標的とは異なるため、これらを活性化するERGOのような化合物は、既存の治療薬が有する副作用の回避や、既存の治療薬と併用することによる相乗効果が期待できるかもしれない。今後の検討課題である。

### 第三章 膜輸送体 OCTN1 によるミクログリアの活性化制御

#### 第一節 緒言

脳に内在する免疫細胞ミクログリアは、脳の恒常性の維持に関与する [29, 30]。ミクログリアは、正常な脳内では、枝分かれした突起を伸ばした静止型として存在し、突起を張り巡らせることで周囲の神経細胞に異常が無いかを監視している [31]。脳の損傷や、ウイルスの感染等に反応するとアメーバ状に肥大化し活性化型となる。活性化型ミクログリアは損傷部位へ遊走されると、免疫反応として、 $\text{TNF}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ 等の炎症性サイトカインやROS、神経栄養因子の産生・放出や、不要な細胞やタンパク質の貪食を担い、神経細胞を保護する [32-34]。一方で、ミクログリアが異常に活性化すると、傷害部位周囲の正常な神経細胞等にも悪影響を与え、慢性的な神経損傷はアルツハイマー病や大うつ病等の精神神経疾患の発症に関与する [35-37]。したがって、ミクログリアの活性化を調節することができれば、種々の精神神経疾患の根本的な治療が可能になるかもしれない。実際、ミクログリアの活性化制御機構として、細胞膜受容体シグナルを介した活性化の調節が数多く研究されている。例えば、プリン受容体は、ミクログリアの代表的な機能である貪食能や遊走能に関与する [109, 110]。

一方、ミクログリアの細胞膜上には、受容体以外に、生理活性物質の取り込みトランスポーターとしてフルクトースを輸送するGLUT5 [111]やグルタミン酸を輸送するGLT-1 [112]が、排出トランスポーターとしてMrp1, 3, 4, 5, Mdr1, BCRP [113]の発現が報告されている。前者は細胞のhomeostasisに必要な物質を細胞内に取り込むsolute carrier superfamilyに、後者は細胞にとって不要あるいは過剰なものを排泄するATP binding cassette superfamilyに属する。Mrp1, 3, 4, 5, Mdr1, BCRPなどのABCトランスポーターは、lipopolysaccharide (LPS) 添加によるミクログリアの活性化に伴い、



mRNA量やタンパク量が増減して機能が変化する [113]。しかしながら、これら膜輸送体とミクログリアの活性化との詳細な関連性についてはほとんど解明されていない。膜受容体の場合は、一過性の速い細胞内シグナル伝達の活性化を特徴とするが、一方で、膜輸送体は膜内外での基質の濃度差を調節するため、膜受容体よりも長期的な細胞機能調節に優れると考えられる。特に、精神神経疾患等の慢性疾患においては、ミクログリアの活性を長期的に調節する必要があるため、膜輸送体を介した細胞の長期的な機能調節が有効かもしれない。

本研究は有機カチオン膜輸送体OCTN1/SLC22A4に着目した。OCTN1は脳、小腸、肝臓、腎臓など体内に幅広く発現しており、また、幅広い有機カチオン性化合物を基質として認識し細胞内に取り込む活性がある [40]。とくに生体内においては食餌由来の抗酸化物質ERGOの吸収、臓器分布、尿細管再吸収などに働く [41]。脳内では神経細胞 [42]やNSCs [38]における発現が報告されているが、ミクログリアにおける発現は分かっていない。末梢の免疫細胞においては、CD14陽性細胞 [47]やlamina propria mononuclear cells [39]に発現する。さらに、マクロファージ株化細胞のTHP-1及びMH7A細胞においては、それぞれLPS、TNF $\alpha$ の刺激により、OCTN1のmRNA量は増加し [39, 48]、また、小腸炎症部位におけるOCTN1のタンパク発現量は、非炎症部位と比較して有意な増加が確認された [39]。食食作用を有する免疫細胞は活性化の際に、細胞内において多量のROSを産生するため、OCTN1を介した抗酸化物質のERGOの取り込みが防御機構として重要なかもしれない。したがって、脳の免疫細胞であるミクログリアにもOCTN1が発現している可能性が高い。ミクログリアの活性化時においても、ROSが多く産生され、ROSは細胞体の肥大化やサイトカインの分泌に関与する。例えば、NADPHオキシダーゼ (NOX) 遺伝子欠損によりROSの産生能を低下させたマウスではミクログリアの肥大化が抑制される [114]。また、抗酸化物質edaravoneの添加は、サイトカイン

の産生を抑制する [49]。したがって、OCTN1はその良好な基質である抗酸化物質ERGOを取り込むことにより、ミクログリアの活性化を抑制することが期待される。

本研究では、まずミクログリアにOCTN1が機能的に発現することを確認するため、マウス由来ミクログリア細胞株BV2と初代培養ミクログリア細胞におけるERGOの取り込み活性を確認した。次に、OCTN1のミクログリア活性化への関与を検討するため、ミクログリアにおけるOCTN1の発現抑制や*octn1*遺伝子欠損が、炎症性サイトカインの産生や細胞体の肥大化に及ぼす影響を評価した。さらには、OCTN1の基質であるERGOのミクログリア活性化への関与についても検討した。

## 第二節 方法

### 3-2-1) 試薬

DMEMは、和光純薬 (Osaka, Japan)より、bovine serum albumin (fatty acid free, low endotoxin, fatty acid free, suitable for cell culture)、poly-L-lysine (m. w. 150,000-300,000)、LPS (L4524)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より、clearsolは、ナカライテスク (Kyoto, Japan)より、L-(+)-ergothioneine-d9 (d9-ERGO) は、Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, Toronto, Canada)より、FBSは、Invitrogen (San Diego, CA, USA)より、<sup>3</sup>H]ergothioneine ([<sup>3</sup>H]ERGO) は、Moravek Biomedicals, Inc.(Brea, California)より、L-(+)-ergothioneineは、KEMPROTEC Ltd. (Carnforth, UK)より、ISOGEN、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、SuperScript III Reverse Transcriptaseは、それぞれNippon Gene (Tokyo, Japan)、TOYOBO (Osaka, Japan)、Invitrogen (San Diego, CA, USA)より購入した。

### 3-2-2) 動物

*octn1*<sup>-/-</sup>-マウスは、WTマウスとのバッククロスを6回行ったマウスを実験に用いた。WTマウス及び*octn1*<sup>-/-</sup>-マウスは、金沢大学学際科学実験センター・実験動物研究施設で繁殖、飼育されたものを用いた [41]。生後3-4週目に離乳し、離乳後のマウスはすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由に与えられた。動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

### 3-2-3) マウス由来ミクログリア細胞株BV2の培養

マウス由来ミクログリア細胞株 (BV2) は、Korea UniversityのEui-Ju Choi博士より提供して頂いた。液体窒素で凍結保存されたBV2を37 °Cの水浴でできるだけ急速に融解した後、37 °Cに温めた培地 (10% FBS、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin含有 DMEM) 中に懸濁した。この懸濁液を127 gで5分間遠心分離し、上清を除去後、再び温めた培地中に懸濁させ、37 °C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター (Hirasawa, Tokyo, Japan)中で培養した。2-3日後にdish底面積の80%程まで細胞が増殖した後に培地をアスピレーターで取り除き、3 mL PBSで1回洗浄し、アスピレーターで吸引後、2.5 mL 0.25% trypsinを添加し細胞をはがした。はがした細胞は遠沈管に回収し、遠心後、上清を取り除き1 mL培地で懸濁し、5 × 10<sup>5</sup> cells/10 cm dishの密度で10 cm dishに撒いた。2-3日間ごとに継代を行った。

トランスポーターの輸送実験及びtotal RNAの抽出には、12あるいは24 well dishに3 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で、ROS imaging実験には、1 × 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種した。細胞播種から48時間後において、500 µM ERGOを含有したFBS不含の培地に置換し、72時間後に各実験を行った。LPSを添加する場合は、各実験開始の0, 1, 2, 4, 6, 8または16時間前に添加した。

### 3-2-4) 初代培養ミクログリアの培養

マウス新生児大脳皮質由来初代培養細胞は、金沢大学学際科学実験センター・実験動物研究施設にて、繁殖させたWT及び*oct1<sup>-/-</sup>*-マウスの生後0-3日齢の新生仔マウスを断頭し、頭蓋骨を除き、全脳を摘出した。摘出した全脳は氷冷したPBS中に回収し、洗浄後、4 °Cに冷やしたPBS中に入れたまま実体顕微鏡下で髄膜を剥がし、大脳皮質を切り出した。大脳皮質を37 °Cに温めた2 mLの培地に2匹分ずつ入れ、軽くホモジナイズした。次に、新生仔2匹分の大脳皮質ホモジネートにつき1 mLの0.25% trypsin液 (5.5 mM glucoseを含むPBS) を加え、15分間37 °Cの水浴中で振盪 (250 rpm) しながら、インキュベートした。15分後、反応を止めるために、馬血清を200 µLと、1 mg/mL DNAase (PBSで希釈) を25 µL添加し、286 gで5分間遠心分離し、得られた沈渣を適当な用量の培養メEDIUM (10% FBS in DMEM) で再懸濁した。このとき、ピペットを用いて塊が見えなくなるまで分散した。その後、あらかじめpoly-L-lysineをコーティングした培養dishに細胞を $2.5 \times 10^5$  cells/dishの細胞密度になるように10 cm dishに播種し、培養dishを良く攪拌してからインキュベーター内に静置した。その後、1週間ごとに培養メEDIUMを交換した [115]。細胞播種後28日目以降に培養dishをPBSで洗浄した後、trypsin溶液 (0.25% trypsin-0.03% EDTA : DMEM = 1 : 4) を加え、30分間インキュベートした。主に、アストロサイトからなる細胞層が培養dishから遊離してくるため、trypsin液とともに除去し、PBSで2回洗浄した。その後、培養dish上に接着している細胞をミクログリアとした。この条件下において、ミクログリアマーカーIsolectinB4及びIba1の陽性細胞の収率は、90%以上である [116]。免疫染色はこの状態で実験に使用し、トランスポーターの輸送試験及びtotal RNAの抽出、ROS imaging、細胞体の形態観察の場合は、このミクログリアにさらに0.25% trypsinを加え5分間イ

ンキュベートし、ピペッティングにてマイクログリアを剥がし、目的の細胞密度にて播種した。トランスポーターの輸送実験及びtotal RNAの抽出には、12 well dishに $1.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で、ROS imaging及び細胞体の形態観察には、24 well dishに $6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種した。ERGO添加実験の場合は、細胞播種から24時間後において、500  $\mu$ M ERGOを含有したFBS不含の培地に置換し、48時間後に各実験を行った。LPSを添加する場合は、各実験開始の1, 2, 4または6時間前に30 ng/mLのLPSを添加した。

### 3-2-5) siRNA導入によるOCTN1の発現抑制

Lipofectamine RNAiMAXをOpti-MEM中に溶解し、5分間室温で静置した。その後導入する *octn1* 遺伝子のsmall interfering RNA（配列: GGCAGUCUGACUGUCCUCAUUGGAA）(Invitrogen, Tokyo, Japan)をOpti-MEM中に100 nMとなるように希釈し、Lipofectamine RNAiMAXと混和後、20分間室温で静置した。siRNAのnegative controlとして、Stealth RNAi siRNA Negative Control Medium GC Duplex #2（Invitrogen, Tokyo, Japan）を使用した。

この間に、3-2-3の方法で培養したBV2を、0.25% trypsin溶液により分散し、抗生物質不含の10% FBSを含むDMEM中に、 $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるように調製した。12 well dishに細胞懸濁液を播種し、直後にsiRNA-Lipofectamine RNAiMAX混合液を加えた。培養24時間後、抗生物質不含の10% FBSを含むDMEMに置換した。48時間後にFBS不含有培地に交換し、培養72時間後に各実験に用いた。

### 3-2-6) 培養細胞における<sup>3</sup>H]ERGO及びd9-ERGOの輸送試験

BV2または初代培養ミクログリア (PMG) は、transport buffer (123 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>/NaOH, pH7.4) で2度洗浄後、再度transport bufferを添加し、37 °Cで5分間インキュベートした。その後、transport bufferをアスピレーターで吸い、薬液 (700 dpm/μLの<sup>3</sup>H]ERGOあるいは10 μM d9-ERGO) を500 μL添加し実験を開始した。実験終了5分前に薬液を10 μL回収した。実験終了時に薬液をアスピレーターで吸い、氷上で冷やしたtransport bufferで3回洗浄した。transport bufferをアスピレーターにより除去し、下記の方法により、細胞中の<sup>3</sup>H]ERGO及びd9-ERGOを測定した。

### 3-2-7) 細胞中の<sup>3</sup>H]ERGOの測定

輸送試験の後、細胞に対して0.2N NaOHを400 μL添加した。水分が蒸発しないようにwellの間の空間に蒸留水を加えdishに蓋をし、パラフィルムでdishと蓋の隙間をふさぎ、84 rpm、室温の条件下で一晩振盪した。細胞が溶解したことを確認後、16 μLの5N HClを加え中和した。100 μLに対して、clearsolを1 mL添加し、vortex後、一晩静置して安定化させ、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。細胞可溶化液のタンパク量はBSAを標準とし、protein assay kit (Bio-Rad Richmond, CA, USA)を用いて測定した。輸送活性は、細胞内の<sup>3</sup>H]ERGO放射活性を、薬液中の<sup>3</sup>H]ERGO濃度及びタンパク量で除した値 (μL/mg of protein) で評価した。

### 3-2-8) 細胞中のd9-ERGOの測定

輸送試験の後、細胞に対してH<sub>2</sub>Oを400 μL添加し、cell scraperを用いて細胞を回収した。検量線サンプルは、標準物質d9-ERGOをcell lysateにより、最終濃度が各々0、3、10、30、100、300、

1000、3000 nMとなるように希釈した。その後、チップソニケーション (TOMY SEIKO Co., Ltd., Tokyo, Japan)により細胞破碎を行い、以下の条件でサンプル調製を行った。45  $\mu$ Lのcell lysateに対して、内標準物質 (cimetidine) を最終濃度が30 nMとなるように15  $\mu$ L、H<sub>2</sub>Oを15  $\mu$ L、AcCNを75  $\mu$ L加えた後、vortexを室温で3分間行い、15,000 rpm、4 °Cで10分間遠心し上清を得た。さらに、この遠心及び上清の単離の過程を2回繰り返す、最終的に得られた上清をLC-MS/MSにより定量した。

<LC/MS/MS condition>

- Instrument : LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Column: SeQuant® ZIC®-cHILIC Column (100 Å, 3  $\mu$ m, 2.1 mm×150 mm; Merck, Frankfurter, Germany)
- Mobile Phase : A) 0.1 % HCOOH

B) 0.1 % HCOOH in AcCN

Time (min)	% of A	% of B
0	5	95
0.5	5	95
3.5	70	30
4.5	70	30
4.6	5	95
7.0	5	95

- Flow rate: 0.4 mL/min
- Column temperature : 40 °C
- Autosampler temperature: 4 °C
- Ionization: Electrospray
- Polarity: Positive
- Multiple Reaction Monitors:
  - d9-ERGO: m/z 239.15 (Precursor ion), m/z 127.00 (Product ion)
  - cimetidine: m/z 253.10 (Precursor ion), m/z 159.10 (Product ion)

### 3-2-9) RT-PCR

PMG及びBV2細胞はそれぞれ、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)またはISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan)を使用し、各々の標準プロトコルに従い、total RNAを抽出した。Oligo (dT)12-18 primer、deoxynucleotide triphosphate mix、RT buffer、MultiScribe™ Reverse

Transcriptaseを用いた逆転写反応により、cDNAを合成した。得られたcDNAと、各標的遺伝子に対応するsense及びantisense primer (Table 2) 及びTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mixを混合し、Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて、定量PCRを行った。PCRの反応は、95 °C、15分 → (95 °C、10秒 → 60 °C、30秒) x 40 cyclesの条件で行った。mRNA発現量は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)によってサンプル間の標準化を行い、相対定量の $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて定量した。

**Table 2. Primers used for real-time PCR analysis in the present study**

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (3'-5')
OCTN1	GCTGGGAGTACGACAAGGAC	GAAGAACAGGGAGGTGGTGA
IL-1 $\beta$	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
TNF $\alpha$	CGTCGTAGCAAACCACCAAG	GAGAACCTGGGAGTAGACAAG
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT

### 3-2-10) 細胞体面積の測定

まず、免疫染色により、ミクログリアの染色を行った。0.75 cm×0.75 cmにカバーガラス (Matsunami Glass Ind.,Ltd., Oosaka, Japan)を切断し、それを70% EtOHに10秒程度浸した後、紫外線照射を両面3分間ずつ行い、細胞を接着させる面を火で4秒間程度あぶったものを入れた24 well dishにPBSで希釈した75  $\mu$ g/mL poly-L-lysineを加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて、少なくとも2時間静置した。Poly-L-lysine溶液を除去しPBSで3回洗浄した後、PBSをよく取り除き、乾燥させ、細胞を播種し培養した。細胞を、PBSで2回洗浄し、4% PAにより、室温、20分間インキュベートすることで固定化した。さらに、3% bovine serum albumin、0.2% Triton X-100を含むPBSに室温、30分



間インキュベートし、ブロッキングを行った。抗Iba-1抗体 (Dako; Santa Clara, CA, USA)を、ブロッキング液を10倍希釈した溶液により、1/1000で希釈し、4 °Cで一晩反応させた。PBSによって、3回洗浄し、Alexa Fluor seriesによって標識された二次抗体 (Alexa Fluor 488 anti-goat IgG) を、ブロッキング液を10倍希釈した溶液により1000倍に希釈し、室温で1時間反応させた。二次抗体反応を終えた細胞は、PBSにより3回洗浄を行い、DAPI封入剤を添加し、周りをマニキュアで密封し、室温、遮光条件下で乾燥させた。観察は、共焦点顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて行った。条件ごとに、細胞60個以上を観察、撮影した。Image Jを用いて、細胞体の周囲の長さや細胞体面積を計測し、各細胞体面積に一つの乱数が対応するようにExcelの「=rand()」を用いて乱数を発生させ、その乱数を昇順に並べ替えて、上位50個の乱数に対応する細胞体面積を採用した。

### 3-2-11) Intracellular ROS Imaging

Yoneyama等のプロトコルを一部修正し実験した [117]。PMGあるいはBV2に対して、10  $\mu$ M DCFH-DAを添加して、37 °C、1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄後、BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence, Osaka, Japan)により観察、撮影を行った。明視野にて撮影範囲を無作為に選択し、撮影した。Image Jを用いて、全細胞数に対する蛍光強度の強い細胞数の割合を評価した。

### 3-2-12) 統計解析

すべての実験は少なくとも3回繰り返して行われた。データは平均値±標準誤差で表記し、studentのt検定を適用し、統計学的に解析した。多群間比較は、一元配置分散分析(ANOVA) を行い、有意差のついた群間においてDunnett's testを行った。p値が0.05未満を統計学的に有意差ありとした。

### 第三節 結果

#### 3-3-1) マウスミクログリアにおけるOCTN1の機能的発現

神経系細胞の中で、神経細胞やNSCsにおけるOCTN1の発現は確認されているが [38, 42]、ミクログリアにおけるOCTN1の発現は不明である。ミクログリアにおけるOCTN1の機能的発現を確かめるために、OCTN1の良好な基質であるERGOを<sup>3</sup>Hあるいは<sup>2</sup>H (D) により標識した化合物の細胞内への取り込み活性を評価した。BV2において、120分まで時間依存的に[<sup>3</sup>H]ERGOの取り込み量が増加した (Fig. 1A)。120分において、500 μMの非標識体ERGOの存在下では、顕著に[<sup>3</sup>H]ERGOの取り込み量が減少した (Fig. 1A)。このERGOの取り込みがOCTN1を介したものであるかどうかを確認するために、siRNA導入によりOCTN1の発現を抑制したBV2及び*octn1*<sup>-/-</sup>-マウス由来PMG (*octn1*<sup>-/-</sup>-PMG) において、[<sup>3</sup>H]ERGOまたはd9-ERGOの取り込み活性を評価した。OCTN1に対するsiRNA (siOCTN1) をBV2に導入すると、対照群である非特異的siRNA導入群と比較して、d9-ERGOの取り込み活性が著しく減少した (Fig. 1B)。さらに、WTマウス由来PMG (WT-PMG) においては、非常に高い[<sup>3</sup>H]ERGOの取り込み活性が確認できたが、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMGは、[<sup>3</sup>H]ERGOをほとんど取り込まなかった (Fig. 1C)。以上より、マウスミクログリアにおいて、OCTN1が機能的に発現し、ERGOを細胞内に輸送することが示唆された。

#### 3-3-2) ミクログリアの活性化に伴うOCTN1の発現上昇

次に、ミクログリアの活性化によるOCTN1の発現への影響を確認するために、BV2にLPSを曝露し活性化させた後、OCTN1 mRNA発現および[<sup>3</sup>H]ERGOの取り込み活性を測定した。まずは、LPSの濃度依存性の有無を調べた。1あるいは3 ng/mLのLPSを6時間曝露すると、OCTN1 mRNAの発

現が約2.5倍に増加し、10-100 ng/mLのLPSを曝露すると、OCTN1 mRNAの発現は約5倍に増加した (Fig. 2A)。次に、LPS曝露の時間依存性について調べた。100 ng/mLのLPSの曝露後、1から8時間まで、時間依存的にOCTN1 mRNA発現量が増加した (Fig. 2B)。OCTN1 mRNA発現の推移と相関して、 $[^3\text{H}]$ ERGOの取り込み活性もまた、LPS曝露後8時間までは時間依存的に増加し、その後、定常に達した (Fig. 2C)。以上より、ミクログリアの活性化に伴い、OCTN1の機能的発現が増加する可能性が示された。

### 3-3-3) ERGOによる細胞内ROS量の抑制

3-3-2までの結果より、BV2及びWT-PMGにおいて、OCTN1は、抗酸化物質のERGOを細胞内に取り込むことが証明された (Fig. 1)。続いて、抗酸化物質ERGOの添加が、ミクログリア内において産生される細胞内ROSを抑制することをROS検出用蛍光試薬のDCFH-DAを用いて評価した。DCFH-DAは、細胞内のROSと反応して、蛍光を発する。BV2及びWT-PMGに対して、LPSを曝露すると、強い蛍光を発する細胞の数が増加したが、ERGOの添加は、LPSによる蛍光強度の上昇を抑制した (Fig. 3A, B)。定量解析においても、ERGOは、LPSによる蛍光強度の上昇を有意に抑制した (Fig. 3C, D)。一方で、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMGにおいては、LPSによる蛍光強度の増加は、ERGO添加によってほとんど抑制できなかった (Data not shown)。以上より、OCTN1を介したERGOの取り込みは、ミクログリアの活性化による細胞内ROSの増加を抑制することが示唆された。

### 3-3-4) ミクログリアの肥大化におけるOCTN1の関与

ミクログリアは炎症時に細胞体が肥大化する [118]。実際に、アルツハイマー病患者の脳

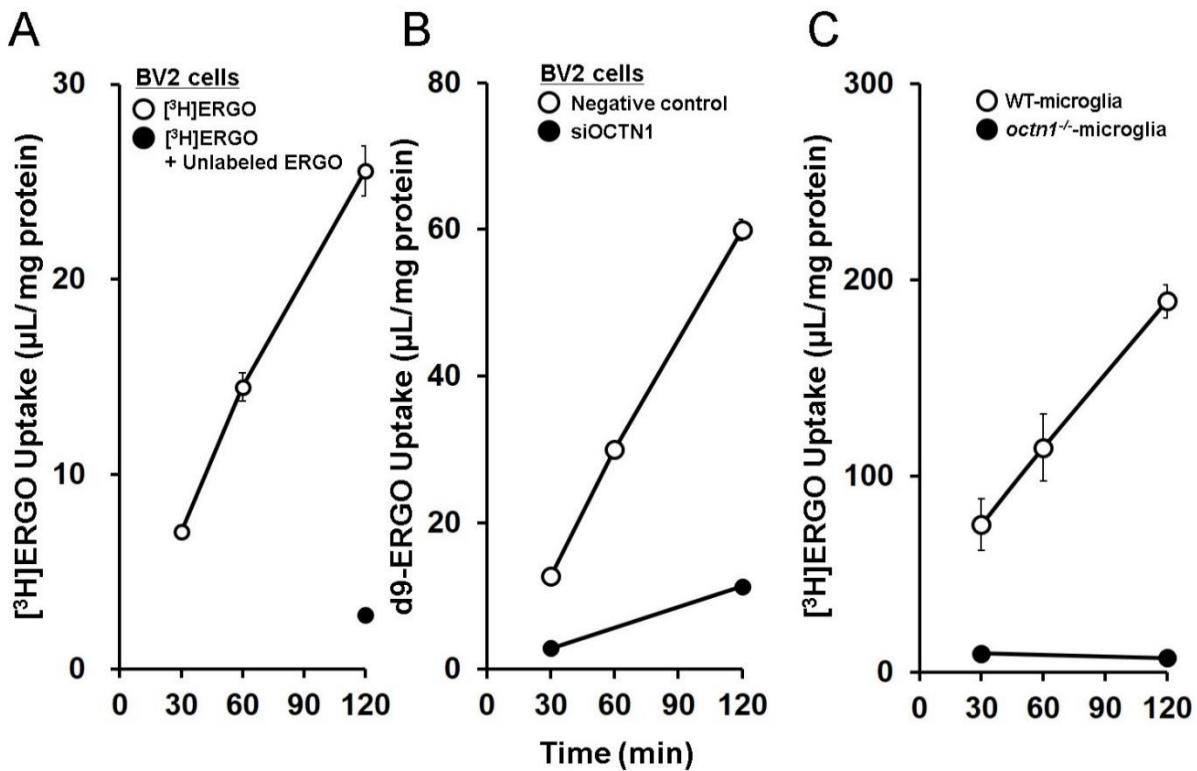
内では、健常人と比較してミクログリアが肥大化する [119]。そこで、OCTN1のミクログリア活性化への関与を評価するために、WT-PMGと *octn1*<sup>-/-</sup>-PMGを用いて細胞体の肥大化を評価した。活性化していないミクログリアの大部分は小さい細胞体を有するため、WT-PMGと *octn1*<sup>-/-</sup>-PMGに対する ERGO単独添加は、細胞体の大きさに影響を及ぼさなかった (Fig. 4A, B)。WT-PMGにおいては、LPS曝露で細胞体が著しく肥大化したが、一方、ERGOの事前添加は、LPSによる細胞体肥大化を抑制した (Fig. 4A)。また、Fig. 4Cは、細胞体の面積をx軸に、細胞体の周囲の長さをy軸にプロットした散布図である。対照群と比較して、プロットの集団が右上に移動する程、細胞体が大きくなることになる。LPS添加によって、プロットの集団は右上に移動する傾向が見られるが、一方、ERGO事前添加によって、その集団は、左下へ移動していることが分かる (Fig. 4C)。さらに、細胞体面積を小さいものから大きいものまで4群に分け、各群の割合を定量解析したものがFig. 4Eである。LPS添加によって、大きい細胞体を有する細胞の割合は、対照群と比較して高いが、一方、ERGOを事前添加することで、LPSによる大きい細胞体を有する細胞の割合は有意に減少した (Fig. 4E)。以上の結果は、OCTN1を介したERGOの取り込みが、LPSによるミクログリアの細胞体の肥大化を抑制することを示唆する。興味深いことに、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMGにおいては、WT-PMGと比較して、LPSによる細胞体の肥大化への影響は小さかった (Fig. 4A-D)。定量解析の結果においても、LPSの添加による *octn1*<sup>-/-</sup>-PMGの細胞体面積の有意な増加は見られなかった (Fig. 4F)。以上より、OCTN1は、ミクログリアの肥大化に何か重要な役割を担っている可能性が考えられる。

### 3-3-5) 炎症性サイトカインの産生におけるOCTN1の関与

次に、ミクログリアの免疫能の一つである炎症性サイトカインの産生におけるOCTN1の関

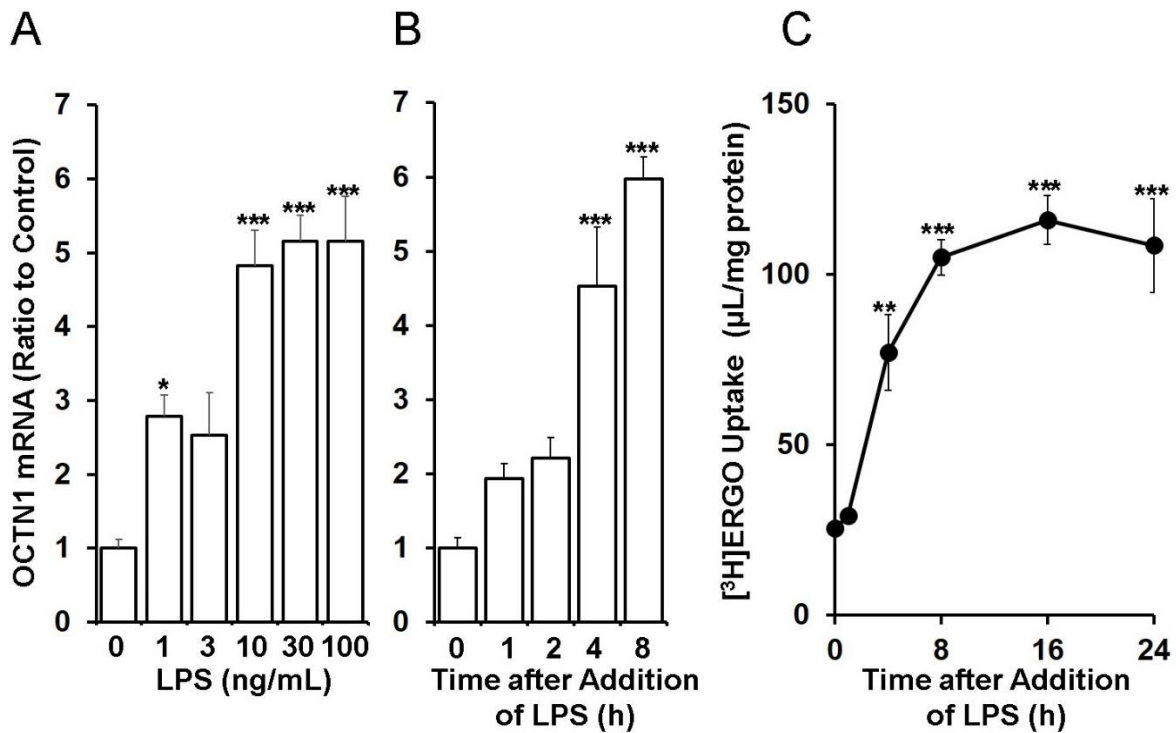
与を検討した。代表的な炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 及びTNF $\alpha$ は、種々の精神神経疾患の発症や増悪に深く関与し [120]、また、ミクログリアに対する抗酸化物質の添加は、これらのサイトカインの発現を抑制するため [49]、特に、IL-1 $\beta$ 及びTNF $\alpha$ に焦点を当てた。BV2及びWT-PMGにおいて、LPSを添加すると、IL-1 $\beta$  mRNA及びTNF $\alpha$  mRNAの発現は有意に増加した (Fig. 5A, C)。このLPSによるIL-1 $\beta$  mRNAの誘導は、negative siRNAを導入したBV2と比較して、siOCTN1を導入したBV2において、より大きかった (Fig. 5A)。また、PMGにおいては、1時間のLPS曝露によるIL-1 $\beta$  mRNAの誘導は、WT-PMGよりも、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMGにおいて大きかった (Fig. 5A)。一方で、LPSによるTNF $\alpha$  mRNAの発現誘導に関しては、BV2及びPMG両細胞において、OCTN1の発現抑制による影響は少なかった (Fig. 5B, D)。以上より、OCTN1はミクログリアによるIL-1 $\beta$ 産生を負に制御することが示された。次に、OCTN1の基質であるERGOがIL-1 $\beta$ 産生を制御していると仮説を立て、ERGO添加による炎症性サイトカインの発現へ及ぼす影響を評価した。予想に反して、ERGOは、LPSによるIL-1 $\beta$ 及びTNF $\alpha$  mRNAの発現誘導に対して、有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。一方で、LPS非添加群のBV2においては、ERGOは、IL-1 $\beta$  mRNA及びTNF $\alpha$  mRNA発現を有意に増加させた (IL-1 $\beta$ : 1.00 $\pm$ 0.17 (-ERGO), 2.54 $\pm$ 0.57 (+ERGO)、TNF $\alpha$ : 1.00 $\pm$ 0.08 (-ERGO), 1.71 $\pm$ 0.19 (+ERGO)) (Fig. 6A, B)。以上の結果より、ミクログリアにおいて、OCTN1がERGO以外の未知の基質の取り込みを介して、IL-1 $\beta$  mRNA発現を負に制御する可能性や、ERGOの薬理作用が濃度によって変化する可能性等が考えられる。

## Figure legends



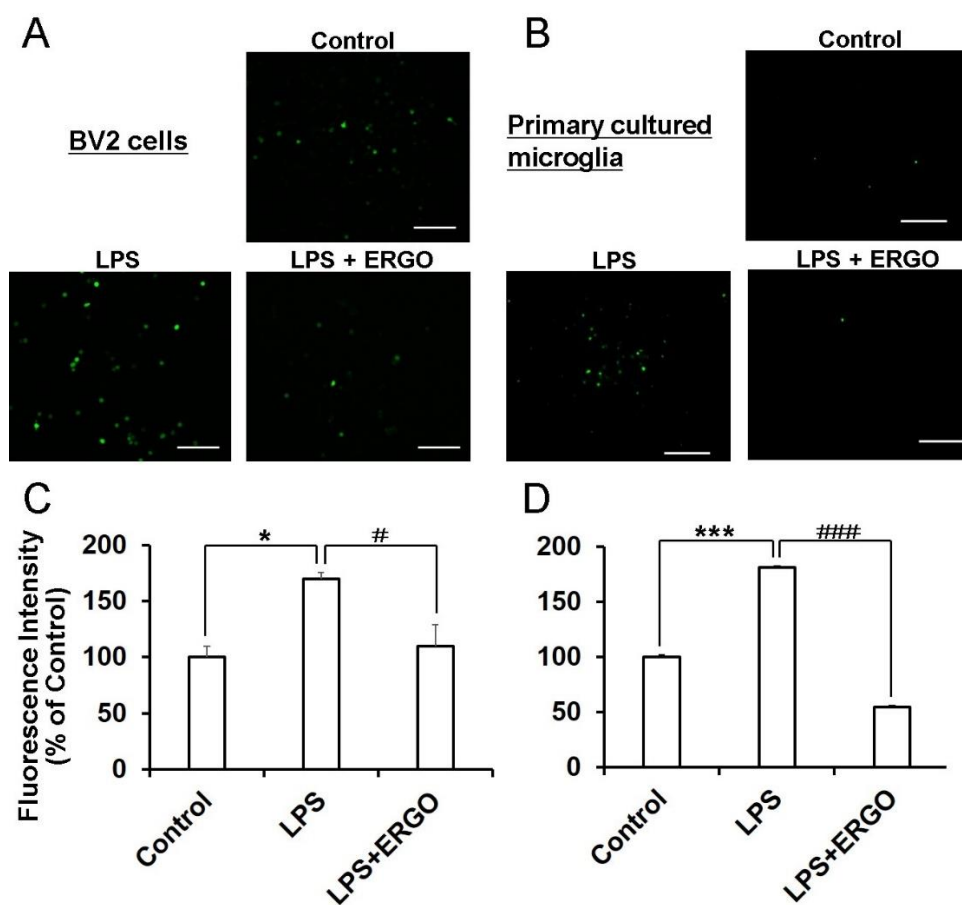
**Figure 1. Functional expression of OCTN1 in BV2 cells and primary cultured microglia.**

(A) BV2 cells cultured for 3 days were incubated with [<sup>3</sup>H]ERGO either in the absence (open circles) or presence (closed circles) of 500 μM unlabeled ERGO, followed by determination of [<sup>3</sup>H]ERGO uptake. Each value represents mean ± S.E.M. (n = 4). (B) BV2 cells were transiently transfected with siOCTN1 (closed circles) or negative control siRNA (open circles), and subsequently cultured for 3 days. The cells were then incubated with d9-ERGO, followed by determination of d9-ERGO uptake. Each value represents mean ± S.E.M. (n = 3). (C) Uptake of [<sup>3</sup>H]ERGO was measured in primary cultured microglia obtained from WT (open circles) or *octn1*<sup>-/-</sup> (closed circles) mice. Each value represents mean ± S.E.M. (n = 3-5).



**Figure 2. Up-regulation of OCTN1 in BV2 cells activated by LPS-stimulation.**

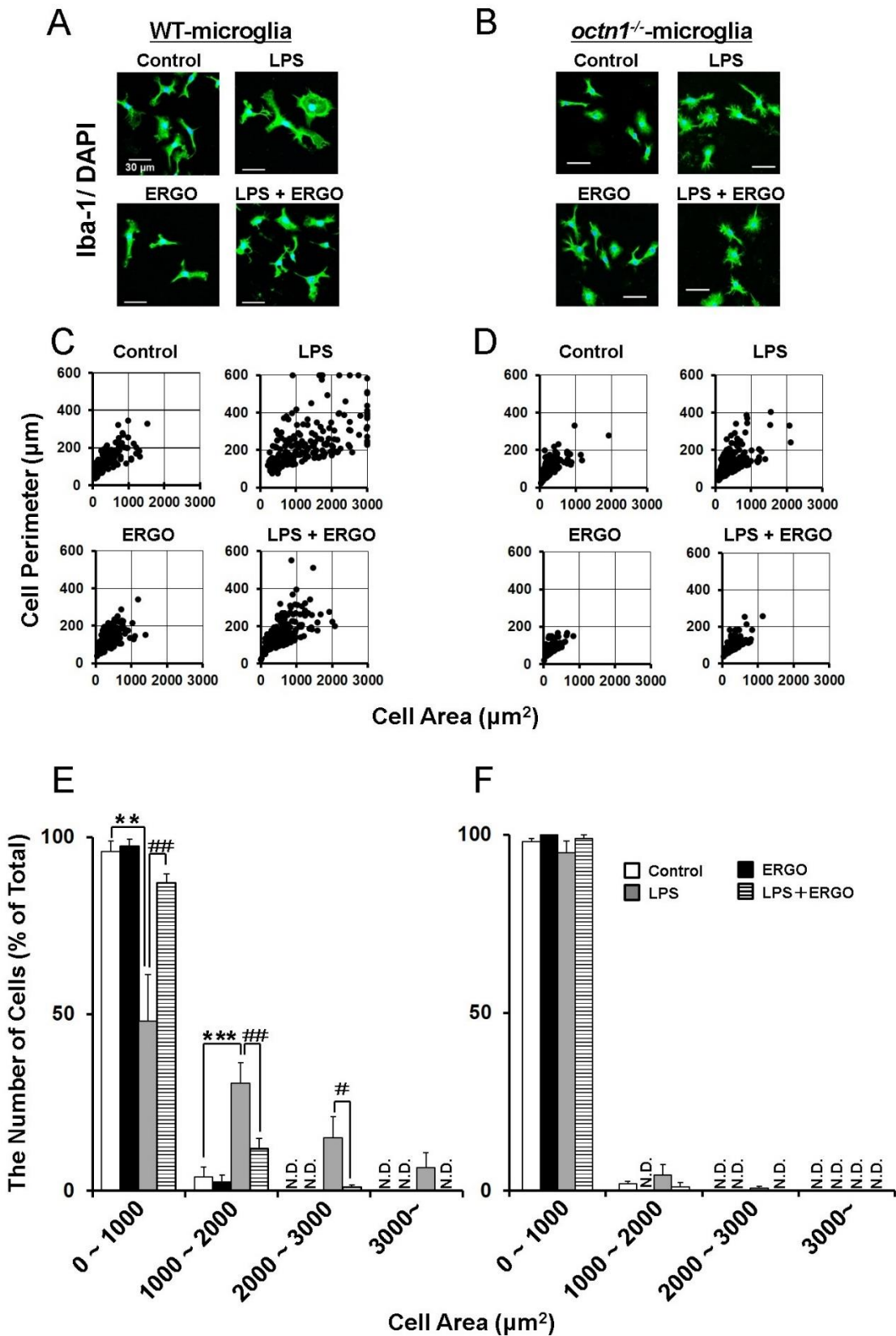
BV2 cells were treated with LPS (1–100 ng/mL) for 6 h (A) or LPS (100 ng/mL) for 1 to 8 h (B), and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis of OCTN1. Each value is normalized by the expression level of GAPDH mRNA and represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4-6). (C) BV2 cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 1 to 24 h, followed by uptake measurement of [<sup>3</sup>H]ERGO for 120 min. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, significant difference from the control value obtained from BV2 cells not treated with LPS.



**Figure 3. Suppression of LPS-induced intracellular ROS by ERGO in BV2 cells and primary cultured microglia.**

BV2 cells (A, C) and primary cultured microglia from WT mice (B, D) were exposed to LPS (100 and 30 ng/mL) for 6 h either in the absence or presence of ERGO (500  $\mu$ M), and DCFH-DA staining was performed for detection of intracellular ROS. Typical fluorescence images obtained in BV2 cells (A) and primary cultured microglia (B) are shown in the upper panels. *Scale bar*: 300  $\mu$ m. The fluorescence images in BV2 cells (C) and primary cultured microglia (D) were quantified using the ImageJ software. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, significant difference from the control value obtained from cells not treated with LPS in the absence of ERGO. #p < 0.05, ###p < 0.001, significant difference from the value obtained from cells treated with LPS in the absence of ERGO.

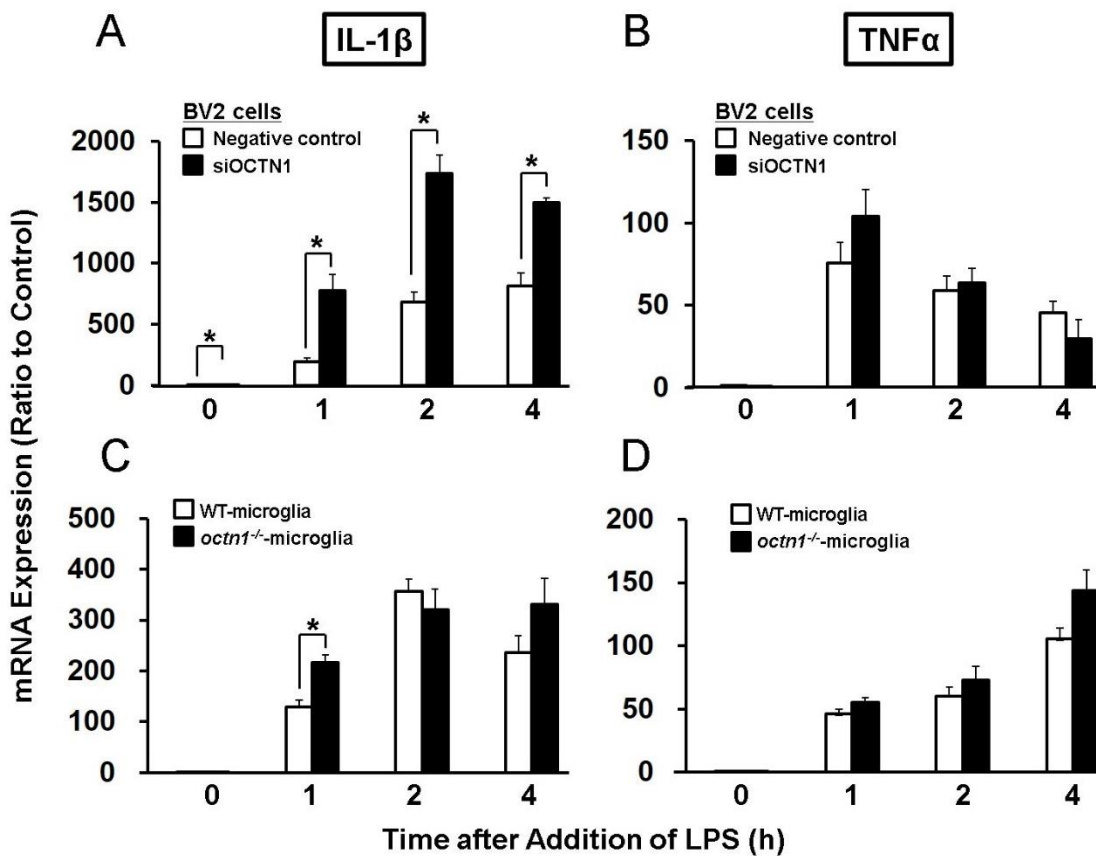




**Figure 4. Involvement of OCTN1 in hypertrophy in primary cultured microglia obtained from WT and *octn1*<sup>-/-</sup>-mice.**

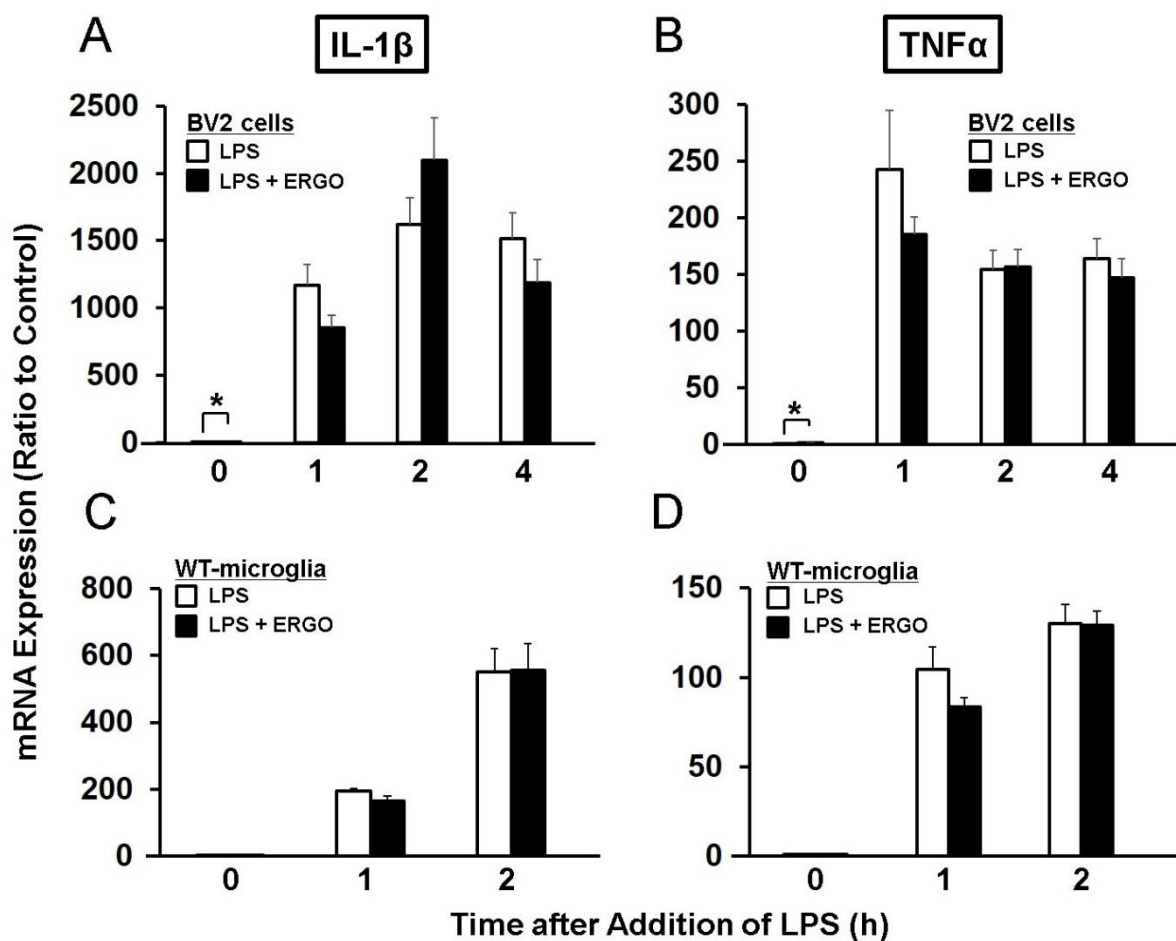
Primary cultured microglia obtained from WT (A, C, E) or *octn1*<sup>-/-</sup> (B, D, F) mice were treated with LPS (30

ng/mL) for 6 h either in the absence or presence of ERGO (500  $\mu$ M). The cells were fixed with 4% PA, followed by immunocytochemical detection of microglial marker Iba-1 (green) and nuclear marker DAPI (blue). Typical fluorescence images are shown in microglia from WT (A) or *octn1*<sup>-/-</sup> (B) mice. *Scale bar*: 30  $\mu$ m. The area and perimeter of cells measured in fluorescence images are shown in the abscissa and ordinate, respectively, in microglia from WT (C) or *octn1*<sup>-/-</sup> (D) mice. (C) Values above 3000  $\mu$ m<sup>2</sup> and 600  $\mu$ m were plotted as 3000  $\mu$ m<sup>2</sup> and 600  $\mu$ m in the abscissa and ordinate, respectively. The percentage of the number of cells with different size of cell bodies was calculated by using the cell area as an indicator in microglia from WT (E) or *octn1*<sup>-/-</sup> (F) mice. Each value represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, significant difference from the control value obtained from cells not treated with LPS in the absence of ERGO. #p < 0.05, ##p < 0.01, significant difference from the value obtained from cells treated with LPS in the absence of ERGO. *N.D.*, not detectable.



**Figure 5. Promotion of inflammatory cytokine production by knockdown of OCTN1 in BV2 cells and primary cultured microglia.**

BV2 cells were transiently transfected with siOCTN1 (black columns) or negative control siRNA (white columns), and subsequently cultured for 3 days. The cells were then treated with LPS (100 ng/mL) for 1 to 4 h, and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis of IL-1 $\beta$  (A) and TNF $\alpha$  (B). Each value is normalized by the expression level of GAPDH mRNA and represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6-7). \*p < 0.05, significant difference from the control value obtained from BV2 cells transfected with negative control. Primary cultured microglia obtained from WT (white columns) or *octn1*<sup>-/-</sup> (black columns) mice were treated with LPS (30 ng/mL) for 1 to 4 h, and total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis of IL-1 $\beta$  (C) and TNF $\alpha$  (D). Each value is normalized by the expression level of GAPDH mRNA and represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5-6). \*p < 0.05, significant difference from the value obtained from primary cultured microglia from WT mice.

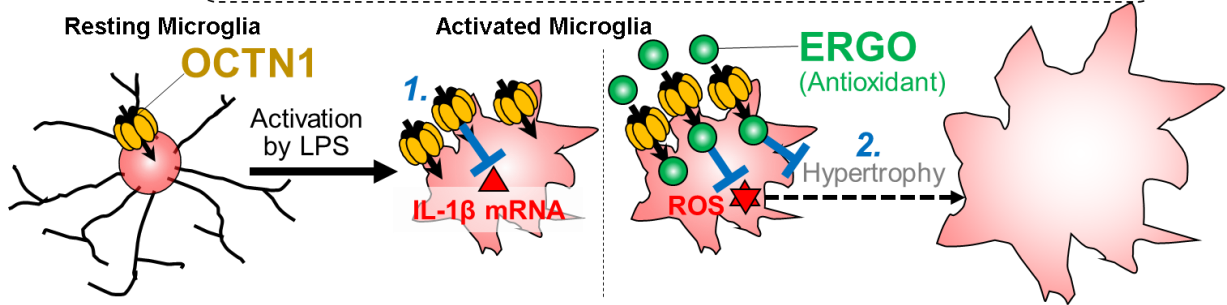


**Figure 6. Effect of ERGO on inflammatory cytokine production in BV2 cells and primary cultured microglia.**

BV2 cells were treated with LPS (100 ng/mL) for 1 to 4 h either in the absence (white columns) or presence (black columns) of ERGO (500  $\mu$ M) (A, B). Primary cultured microglia from WT mice were treated with LPS (30 ng/mL) for 1 to 2 h either in the absence (white columns) or presence (black columns) of ERGO (500  $\mu$ M) (C, D). Total RNA was extracted for quantitative RT-PCR analysis of IL-1 $\beta$  (A, C) and TNF $\alpha$  (B, D). Each value is normalized by the expression level of GAPDH mRNA and represents mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4). \*p < 0.05, significant difference from the control value obtained from the absence of ERGO.

**Wild-type**

1. OCTN1 suppressed mRNA expression of IL-1 $\beta$ . However, addition of ERGO did not suppress it.
2. OCTN1-mediated ERGO uptake suppressed hypertrophy at least partially via reduction of intracellular ROS.



***octn1*<sup>-/-</sup>**

3. *octn1*<sup>-/-</sup> microglia did not show hypertrophy. OCTN1 may be important for hypertrophy of microglia.

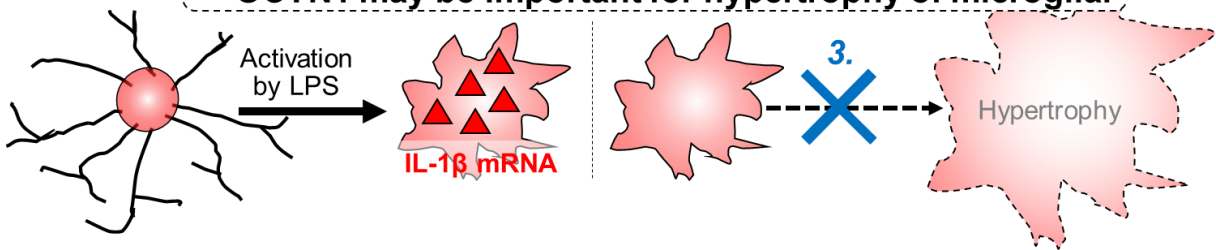


Figure 7. Involvement of OCTN1 in microglial activation.

## 第四節 考察

### 3-4-1) 膜輸送体によるミクログリアの活性化制御の意義

本研究により初めて、脳免疫細胞ミクログリアにおいて、膜輸送体 OCTN1 が機能的に発現していることが証明された。さらに、OCTN1 を介した抗酸化物質 ERGO の取り込みによる細胞内 ROS の抑制、あるいは、ERGO 以外の基質の取り込みによる未知の作用機序により、ミクログリアの活性化を制御することが示唆された。これまでプリン受容体をはじめとする膜受容体シグナルがミクログリアの活性化を制御するとの報告は多くあったが [110, 121, 122]、膜輸送体によるミクログリアの活性化制御はほとんど明らかとなっていない。本研究より、受容体による活性化制御に加えて、膜輸送体によってもミクログリアの活性化が制御できる可能性が示された。膜受容体の場合は、一過性の速い細胞内シグナル伝達の活性化を特徴とするが、一方で、膜輸送体は膜内外での基質の濃度差を調節するため、膜受容体よりも長期的な細胞機能調節に優れると考えられる。慢性的な神経炎症が症状の進行に関与するアルツハイマー病や大うつ病等の精神神経疾患に対しては [35-37, 123, 124]、長期的にミクログリアの活性を調節する必要がある。したがって、膜輸送体を標的としたミクログリアの長期的な活性調節は、種々の精神神経疾患に対する新たな治療戦略として期待される。

### 3-4-2) OCTN1 による ERGO の取り込みは、細胞内 ROS の抑制を介し肥大化を抑制する

BV2 および WT-PMG において時間依存的な ERGO の取り込み活性があり (Fig. 1A, C)、この取り込みは siOCTN1 の導入によって低下し (Fig. 1B)、また、WT-PMG に比べ *octn1*<sup>-/-</sup>-PMG で顕著に低かった (Fig. 1C)。さらに、抗酸化物質 edaravone と同様に、ERGO 存在下では LPS 添加によ

る細胞内 ROS の増加が抑制された (Fig. 3)。したがって、ミクログリアに発現する OCTN1 は、細胞内に抗酸化物質 ERGO を取り込み、細胞内 ROS 量を抑制することが実証された。細胞内 ROS の抑制は、ミクログリアの肥大化を抑える。例えば、NADPH オキシダーゼ (NOX) 遺伝子欠損により ROS の産生能を低下させたマウスではミクログリアの肥大化が抑制される [114]。LPS によるミクログリアの肥大化は、抗酸化物質 edaravone (Data not shown)により抑制される [49]。同様に、ERGO の添加によっても LPS によるミクログリアの肥大化は抑制された (Fig. 4A, C, E)。したがって、OCTN1 により細胞内に取り込まれた ERGO は、抗酸化作用により細胞内 ROS を抑制することで、肥大化を抑えたと推察される。アルツハイマー病やパーキンソン病の患者の脳内では、異常に肥大化したミクログリアが確認され、肥大化と精神神経疾患との関連性が報告されている [125-127]。また、アルツハイマーモデルマウスに抗生物質ミノサイクリンを投与すると、ミクログリア肥大化の抑制とともに、空間学習能力が改善する [128]。したがって、OCTN1 を介した ERGO 取り込みによるミクログリアの肥大化抑制は、精神神経疾患の増悪抑制や空間学習能力の改善につながる可能性がある。一方、WT-PMG に対する LPS 添加によって観察された細胞体の肥大化は、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMG においてはほとんど確認されなかった (Fig. 4B, D, F)。この理由は不明のままであるが、下記のよう推察した。例えば、SIRT1 は細胞体の肥大化に関係するが、OCTN1 の基質である ERGO は、培養内皮細胞において SIRT1 の発現を正に制御することが分かっている [72, 129, 130]。OCTN1 の遺伝子欠損によって、SIRT1 等の細胞体の肥大化に関与する遺伝子の発現が抑制されたことで、ミクログリアの肥大化が抑えられたのかもしれない [72, 129, 130]。また、ミクログリアの肥大化を促進する物質を OCTN1 が取り込み、OCTN1 の欠損により肥大化促進物質が取り込めなかった可能性も考えられる。OCTN1 の遺伝子欠損による肥大化抑制のメカニズムを解明するため、今後さらな

る検討が必要である。

### 3-4-3) OCTN1 による炎症性サイトカインの発現制御

WT-PMG 及び *octn1*<sup>-/-</sup>-PMG の炎症性サイトカイン発現を比較すると、LPS 存在下においては、*octn1*<sup>-/-</sup>-PMG の IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が有意に高かった (Fig. 5C)。また、siOCTN1 を導入した BV2 では、対照群と比較して、LPS 存在、非存在下において、IL-1 $\beta$  の発現は有意に高かった (Fig. 5A)。この結果は OCTN1 が IL-1 $\beta$  の発現を負に制御することを示唆する。LPS によるミクログリアのサイトカイン産生経路には、ROS の産生を介する経路と ROS の産生が寄与しない二つの経路がある [120, 132]。前者の経路が主だとすると、OCTN1 は培地中の ERGO を細胞内に取り込み、細胞内 ROS を抑制することによって、IL-1 $\beta$  の発現を抑制する可能性がある。しかしながら、BV2 及び WT-PMG において、24 時間の ERGO 事前添加は、LPS の曝露による IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の発現上昇に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。LPS によって活性化されたミクログリアにおいて、ERGO による細胞内 ROS の抑制は確認されたため (Fig. 3)、本研究において LPS による炎症性サイトカインの発現誘導は、主に細胞内 ROS の産生が寄与しない経路であるのかもしれない。一方、OCTN1 による LPS 誘導 IL-1 $\beta$  発現上昇の抑制は、OCTN1 が ERGO 以外の基質を取り込むことによる可能性がある。OCTN1 を介して細胞内に取り込まれた ERGO が細胞内 ROS を抑制してサイトカインの発現を抑制する一方、高濃度添加された細胞外 ERGO がサイトカインの発現を負に制御する OCTN1 基質の取り込みを阻害し、結果としてサイトカインの発現抑制が見えなかった可能性も考えられる。BV2 細胞において siOCTN1 導入によって、IL-1 $\beta$  の発現が著しく増加したのも、OCTN1 が、IL-1 $\beta$  の発現を負に制御する 2 つの基質、ERGO 及び未知の基質を取り込めなくなったことに起因するか



もしれない。LPS 非添加時の BV2 においては、siOCTN1 導入により IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が増加する (Fig. 5) 一方、ERGO 添加によっても IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  の発現は増加した (Fig. 6)。これらの結果からも、ERGO 以外に炎症性サイトカインの発現を負に制御する OCTN1 の基質が存在し、その取り込みを ERGO が阻害する可能性は支持される。*In vitro* において OCTN1 基質の報告があるアセチルコリンは [133]、炎症性サイトカインの発現を抑制するため、その候補となり得るかもしれない [134]。

#### 3-4-4) LPS 刺激による OCTN1 の機能的発現の増加について

LPS 添加による BV2 の活性化に伴って OCTN1 の機能的発現が増加した (Fig. 2)。この結果は、THP-1 細胞に LPS 添加することで OCTN1 の発現が増加するという報告 [39]とも類似する。また、LPS によるミクログリアの活性化は IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  の発現を増加させた (Fig. 3)。MH7A 細胞に IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  を添加することにより、OCTN1 の mRNA 発現誘導が起こる [48]。したがって、ミクログリアにおいて、LPS 添加により IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  が産生され、これらのサイトカインによってさらに OCTN1 が誘導された可能性が考えられる。ミクログリアの異常な活性化による炎症性サイトカインや ROS の過剰な放出が神経障害を引き起こし、種々の精神神経疾患の発症や進展に関与する [120]。したがって、ミクログリアの活性化を負に制御する OCTN1 の発現が増加することは、細胞の異常な活性化を防ぐ防御機構と考えられる。また、OCTN1 は基質認識性が幅広いため、臨床使用薬の中には OCTN1 を阻害するものが多くある。例えば、アルツハイマー治療薬のドネペジルは OCTN1 の基質であり [135]、抗ヒスタミン薬のピリラミンや、高血圧薬のクロニジンは OCTN1 の阻害剤である [40]。いずれも、作用点が脳である薬であるため、ミクログリアにおける

OCTN1 の輸送機能の抑制により、ミクログリアの異常な活性化が起きる可能性があるかもしれない。さらには、ヒトにおいて OCTN1 は一塩基多型が存在し、輸送能に影響を与えるため、ミクログリアの活性化に影響を及ぼす可能性がある [136-139]。種々の治療薬や遺伝子変異によるミクログリアにおける OCTN1 の機能変化によって、精神神経疾患に対する脆弱性がどのような影響を受けるのかは、今後の重要な検討課題である。

### 3-4-5) 結論

膜輸送体 OCTN1 はミクログリアに機能的に発現しており、抗酸化物質 ERGO を細胞内に取り込むことが証明された。OCTN1 を介した ERGO の取り込みは、ミクログリアの活性化に伴う細胞内 ROS の増加を抑制することで、ミクログリアの細胞体の肥大化を抑制した。さらには、OCTN1 は、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の誘導を負に制御した (Fig. 7)。今後、OCTN1 によるミクログリアの長期的な活性調節を介した種々の精神神経疾患に対する治療への応用のため、さらなる研究が必要である。

## 第四章 結論

有機カチオン膜輸送体 OCTN1 は、NSCs において、アミノ酸 ERGO の細胞内への取り込みを介して、S6K1 (Thr389) 及び NT5/TrkB シグナルを活性化し、神経分化を促進する。また、OCTN1 はミクログリアに機能的に発現しており、OCTN1 を介した抗酸化物質 ERGO の取り込みを介して、細胞内 ROS の増加を抑制することで、ミクログリアの細胞体の肥大化を抑制する。さらには、OCTN1 は、ミクログリアにおける炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の誘導を負に制御した。

NSCs 及びミクログリア両細胞に共通して発現する OCTN1 は、ERGO 等の輸送を介して、神経新生を促進しミクログリア活性化を抑制するため、神経新生の抑制やミクログリアの活性化が生じる大うつ病等の精神神経疾患の治療の標的として有効かもしれない。また、OCTN1 の基質である ERGO は、脳移行性が高く、安全な食用のタモギタケに豊富に含有する水溶性の抗酸化物質であり比較的安全な化合物と考えられるため、慢性化しやすい精神神経疾患等の長期的な治療に有効かもしれない。

## 引用文献

1. C.T. Ekdahl, Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front. Pharmacol.* 3 (2012) 41.
2. K. Forsberg, S. Di Giovanni, Cross Talk between Cellular Redox Status, Metabolism, and p53 in Neural Stem Cell Biology. *Neuroscientist* 20 (2014) 326-342.
3. H.A. Jurgens, R.W. Johnson, Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp. Neurol.* 233 (2012) 40-48.
4. M.A. Michell-Robinson, H. Touil, L.M. Healy, D.R. Owen, B.A. Durafour, A. Bar-Or, J.P. Antel, C.S. Moore, Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain.* 138 (2015) 1138-1159.
5. K.I. Mosher, R.H. Andres, T. Fukuhara, G. Bieri, M. Hasegawa-Moriyama, Y. He, R. Guzman, T. Wyss-Coray, Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 1485-1487.
6. L. Peferoen, M. Kipp, P. van der Valk, J.M. van Noort, S. Amor, Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* 141 (2014) 302-313.
7. S. Pendyam, A. Mohan, P.W. Kalivas, S.S. Nair, Role of perisynaptic parameters in neurotransmitter homeostasis--computational study of a general synapse. *Synapse* 66 (2012) 608-621.
8. S.D. Kuipers, C.R. Bramham, H.A. Cameron, C.P. Fitzsimons, A. Korosi, P.J. Lucassen, Environmental control of adult neurogenesis: from hippocampal homeostasis to behavior and disease. *Neural Plast.* 2014 (2014) 808643.
9. Q. Li, B.A. Barres, Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *in press.*
10. C.B. Johansson, S. Momma, D.L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, J. Frisén, Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96 (1999) 25-34.
11. B.A. Reynolds, S. Weiss, Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian

- embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* 175 (1996) 1-13.
12. M.A. Hilliard, Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug-of-war. *J. Neurochem.* 108 (2009) 23-32.
  13. P.J. Horner, F.H. Gage, Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407 (2000) 963-970.
  14. R. Knoth, I. Singec, M. Ditter, G. Pantazis, P. Capetian, R.P. Meyer, V. Horvat, B. Volk, G. Kempermann, Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5 (2010) e8809.
  15. G.L. Ming, H. Song, Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70 (2011) 687-702.
  16. C.L. Zhang, Y. Zou, W. He, F.H. Gage, R.M. Evans, A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451 (2008) 1004-1007.
  17. A.J. Eisch, D. Petrik, Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338 (2012) 72-75.
  18. L.D. LaDage, Environmental Change, the Stress Response, and Neurogenesis. *Integr. Comp. Biol.* 55 (2015) 372-383.
  19. J.N. Le Grand, L. Gonzalez-Cano, M.A. Pavlou, J.C. Schwamborn, Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2015) 773-797.
  20. A. Sahay, R. Hen, Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 1110-1115.
  21. J.S. Snyder, A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel, H.A. Cameron, Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476 (2011) 458-461.

22. S. Bolognin, M. Buffelli, J. Puoliväli, K. Iqbal, Rescue of cognitive-aging by administration of a neurogenic and/or neurotrophic compound. *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 2134-2146.
23. J.L. Warner-Schmidt, R.S. Duman, Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16 (2006) 239-249.
24. Y. Li, B.W. Luikart, S. Birnbaum, J. Chen, C.H. Kwon, S.G. Kernie, R. Bassel-Duby, L.F. Parada, TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59 (2008) 399-412.
25. T.D. Perera, S. Park, Y. Nemirovskaya, Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment. *Neuroscientist* 14 (2008) 326-338.
26. E. Horgusluoglu, K. Nudelman, K. Nho, A.J. Saykin, Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 174 (2017) 93-112.
27. J. Pascual-Brazo, V. Baekelandt, J.M. Encinas, Neurogenesis as a new target for the development of antidepressant drugs. *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 3763-3775.
28. A. Thompson, K. Boekhoorn, A.M. Van Dam, P.J. Lucassen, Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav.* 1 (2008) 28-42.
29. A. Aguzzi, B.A. Barres, M.L. Bennett, Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339 (2013) 156-161.
30. A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, F. Helmchen, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308 (2005) 1314-1318.
31. D. Davalos, J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L. Dustin, W.B. Gan, ATP

- mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 752-758.
32. U.K. Hanisch, H. Kettenmann, Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 1387-1394.
33. H. Wake, A.J. Moorhouse, A. Miyamoto, J. Nabekura, Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36 (2013) 209-217.
34. J. Pan, J.L. Jin, H.M. Ge, K.L. Yin, X. Chen, L.J. Han, Y. Chen, L. Qian, X.X. Li, Y. Xu, Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPAR $\gamma$ -dependent manner. *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 51.
35. A. Gerhard, N. Pavese, G. Hotton, F. Turkheimer, M. Es, A. Hammers, K. Eggert, W. Oertel, R.B. Banati, D.J. Brooks, In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 21 (2006) 404-412.
36. A.R. Simard, D. Soulet, G. Gowing, J.P. Julien, S. Rivest, Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49 (2006) 489-502.
37. R. Yirmiya, N. Rimmerman, R. Reshef, Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 38 (2015) 637-658.
38. T. Ishimoto, N. Nakamichi, H. Hosotani, Y. Masuo, T. Sugiura, Y. Kato, Organic cation transporter-mediated ergothioneine uptake in mouse neural progenitor cells suppresses proliferation and promotes differentiation into neurons. *PLoS One* 9 (2014) e89434.
39. T. Shimizu, Y. Masuo, S. Takahashi, N. Nakamichi, Y. Kato, Organic cation transporter Octn1-mediated uptake of food-derived antioxidant ergothioneine into infiltrating macrophages during intestinal inflammation in mice.

Drug Metab. Pharmacokinet. 30 (2015) 231-239.

40. H. Yabuuchi, I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, A. Tsuji, Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999)768-773.
41. Y. Kato, Y. Kubo, D. Iwata, S. Kato, T. Sudo, T. Sugiura, T. Kagaya, T. Wakayama, A. Hirayama, M. Sugimoto, K. Sugihara, S. Kaneko, T. Soga, M. Asano, M. Tomita, T. Matsui, M. Wada, A. Tsuji, Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm. Res.* 27 (2010) 832-840.
42. N. Nakamichi, T. Taguchi, H. Hosotani, T. Wakayama, T. Shimizu, T. Sugiura, S. Iseki, Y. Kato, Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1 in mouse brain neurons: possible involvement in neuronal differentiation. *Neurochem. Int.* 61 (2012) 1121-1132.
43. N. Nakamichi, K. Nakayama, T. Ishimoto, Y. Masuo, T. Wakayama, H. Sekiguchi, K. Sutoh, K. Usumi, S. Iseki, Y. Kato, Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice. *Brain and Behavior* 6 (2016) e00477.
44. T. Hatano, S. Saiki, A. Okuzumi, R.P. Mohny, N. Hattori, Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87 (2016) 295-301.
45. I.K. Cheah, L. Feng, R.M. Tang, K.H. Lim, B. Halliwell, Ergothioneine levels in an elderly population decrease with age and incidence of cognitive decline; a risk factor for neurodegeneration? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478 (2016) 162-167.
46. N. Nakamichi, Y. Kato, Physiological Roles of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1/SLC22A4 in Neural Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 40 (2017) 1146-1152.



47. I.K. Cheah, B. Halliwell, Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 822 (2012) 784-793.
48. T. Maeda, M. Hirayama, D. Kobayashi, K. Miyazawa, I. Tamai, Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 394-401.
49. Y. Yuan, H. Zha, P. Rangarajan, E.A. Ling, C. Wu, Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. *BMC. Neurosci.* 15 (2014) 125.
50. T.Y. Song, H.C. Lin, C.L. Chen, J.H. Wu, J.W. Liao, M.L. Hu, Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Free Radic. Res.* (2014) 1049-1060.
51. A.M. Bond, G.L. Ming, H. Song, Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17 (2015) 385-395.
52. C.J. Hong, H. Park, S.W. Yu, Autophagy for the quality control of adult hippocampal neural stem cells. *Brain Res.* 1649 (2016) 166-172.
53. H. Ito, A. Nakajima, H. Nomoto, S. Furukawa, Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 648-658.
54. L. Bar-Peled, D.M. Sabatini, Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 400-406.
55. R.L. Wolfson, L. Chantranupong, R.A. Saxton, K. Shen, S.M. Scaria, J.R. Cantor, D.M. Sabatini, Sestrin2 is a

- leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351 (2015) 43-48.
56. N.W. Hartman, T.V. Lin, L. Zhang, G.E. Paquelet, D.M. Feliciano, A. Bordey, mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo. *Cell Rep.* 5 (2013) 433-444.
57. J.E. Lee, M.S. Lim, J.H. Park, C.H. Park, H.C. Koh, S6K Promotes Dopaminergic Neuronal Differentiation Through PI3K/Akt/mTOR-Dependent Signaling Pathways in Human Neural Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 3771-3782.
58. L. Magri, R. Galli, mTOR signaling in neural stem cells: from basic biology to disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 2887-2898.
59. Z.M. Ignácio, G.Z. Réus, C.O. Arent, H.M. Abelaira, M.R. Pitcher, J. Quevedo, New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 82 (2016) 1280-1290.
60. H. Kitajima, S. Yoshimura, J. Kokuzawa, M. Kato, T. Iwama, T. Motohashi, T. Kunisada, N. Sakai, Culture method for the induction of neurospheres from mouse embryonic stem cells by coculture with PA6 stromal cells. *J. Neurosci. Res.* 80 (2005) 467-474.
61. W. Zhou, N. Wang, C. Yang, X.M. Li, Z.Q. Zhou, J.J. Yang, Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur. Psychiatry* 29 (2014) 419-423.
62. T.A. Lin, X. Kong, A.R. Saltiel, P.J. Blakeshear, J.C. Jr. Lawrence, Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated

- protein kinase-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18531-18538.
63. L. Beretta, Y.V. Svitkin, N. Sonenberg, Rapamycin stimulates viral protein synthesis and augments the shutoff of host protein synthesis upon picornavirus infection. *J. Virol.* 70 (1996) 8993-8996.
64. K. Oishi, K. Watatani, Y. Itoh, H. Okano, F. Guillemot, K. Nakajima, Y. Gotoh, Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 13064-13069.
65. S.R. Alcalá-Barraza, M.S. Lee, L.R. Hanson, A.A. McDonald, W.H. Frey, L.K. McLoon, Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J. Drug Target.* 18 (2010) 179-190.
66. F. Ingoglia, R. Visigalli, B.M. Rotoli, A. Barilli, B. Riccardi, P. Puccini, M. Milioli, M. Di Lascia, G. Bernuzzi, V. Dall'Asta, Human macrophage differentiation induces OCTN2-mediated L-carnitine transport through stimulation of mTOR-STAT3 axis. *J. Leukoc. Biol.* 101 (2017) 665-674.
67. J. Dyachok, S. Earnest, E.N. Iturraran, M.H. Cobb, E.M. Ross, Amino Acids Regulate mTORC1 by an Obligate Two-step Mechanism. *J. Biol. Chem.* 291(2016) 22414-22426.
68. R.L. Prizant, I. Barash, Negative effects of the amino acids Lys, His, and Thr on S6K1 phosphorylation in mammary epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 105 (2008) 1038-1047.
69. Y. Ishizuka, N. Kakiya, H. Nawa, N. Takei, Leucine induces phosphorylation and activation of p70S6K in cortical neurons via the system L amino acid transporter. *J. Neurochem.* 106 (2008) 934-942.
70. R.L. Wolfson, L. Chantranupong, R.A. Saxton, K. Shen, S.M. Scaria, J.R. Cantor, D.M. Sabatini, Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 351 (2016) 43-48.
71. M. Saitoh, N. Pullen, P. Brennan, D. Cantrell, P.B. Dennis, G. Thomas, Regulation of an activated S6 kinase 1

- variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20104-20112.
72. N. D'Onofrio, L. Servillo, A. Giovane, R. Casale, M. Vitiello, R. Marfella, G. Paolisso, M.L. Balestrieri, Ergothioneine oxidation in the protection against high-glucose induced endothelial senescence: Involvement of SIRT1 and SIRT6. *Free Radic. Biol. Med.* 96 (2016) 211-222.
73. M. Igarashi, L. Guarente, mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell* 166 (2016) 436-450.
74. A. Romanelli, V.C. Dreisbach, J. Blenis, Characterization of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70 S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40281-40289.
75. S.W. Park, J.G. Lee, M.K. Seo, C.H. Lee, H.Y. Cho, B.J. Lee, W. Seol, Y.H. Kim, Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17 (2014) 1831-1846.
76. D. Xu, Y. Sun, C. Wang, H. Wang, Y. Wang, W. Zhao, G. Bao, F. Wang, Z. Cui, B. Jiang, Hippocampal mTOR signaling is required for the antidepressant effects of paroxetine. *Neuropharmacology* 128 (2017) 181-195.
77. M.E. Glover, P.C. Pugh, N.L. Jackson, J.L. Cohen, A.D. Fant, H. Akil, S.M. Clinton, Early-life exposure to the SSRI paroxetine exacerbates depression-like behavior in anxiety/depression-prone rats. *Neuroscience* 284 (2015) 775-797.
78. T. Deltheil, B.P. Guiard, J. Cerdan, D.J. David, K.F. Tanaka, C. Repérant, J.P. Guilloux, F. Coudoré, R. Hen, A.M. Gardier, Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-

- derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology* 55 (2008) 1006-1014.
79. Z.W. Peng, F. Xue, H.N. Wang, R.G. Zhang, Y.C. Chen, Y. Wang, L.Y. Zhang, J. Fan, Q.R. Tan, Paroxetine up-regulates neurogenesis in hippocampus-derived neural stem cell from fetal rats. *Mol. Cell. Biochem.* 375 (2013) 105-113.
80. M.K. Seo, C.M. Choi, R.S. McIntyre, H.Y. Cho, C.H. Lee, R. Mansur, Y. Lee, J.H. Lee, Y.H. Kim, S.W. Park, J.G. Lee, Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. *BMC. Neurosci.* 18 (2017) 39.
81. N. Li, B. Lee, R.J. Liu, M. Banasr, J.M. Dwyer, M. Iwata, X.Y. Li, G. Aghajanian, R.S. Duman, mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329 (2010) 959-964.
82. J.F. Cryan, O.F. O'Leary, Neuroscience. A glutamate pathway to faster-acting antidepressants? *Science* 329 (2010) 913-914.
83. S. Mansouri, I. Agartz, S.O. Ögren, C. Patrone, M. Lundberg, PACAP Protects Adult Neural Stem Cells from the Neurotoxic Effect of Ketamine Associated with Decreased Apoptosis, ER Stress and mTOR Pathway Activation. *PLoS One* 12 (2017) e0170496.
84. K.L. Jansen, R. Darracot-Cankovic, The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. *J. Psychoactive Drugs* 33 (2001) 151-158.
85. W. Tao, Y. Dong, Q. Su, H. Wang, Y. Chen, W. Xue, C. Chen, B. Xia, J. Duan, G. Chen, Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. *Behav. Brain Res.* 308 (2016) 177-186.

86. C. Blázquez, A. Chiarlone, L. Bellocchio, E. Resel, P. Pruunsild, D. García-Rincón, M. Sendtner, T. Timmusk, B. Lutz, I. Galve-Roperh, M. Guzmán, The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1618-1629.
87. F.L. Pazini, M.P. Cunha, J.M. Rosa, A.R. Colla, V. Lieberknecht, Á. Oliveira, A.L. Rodrigues, Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) :6818-6834.
88. Z. Hua, X. Gu, Y. Dong, F. Tan, Z. Liu, C.J. Thiele, Z. Li, PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour. Biol. in press.*
89. Y. Shen, N. Inoue, K. Heese, Neurotrophin-4 (ntf4) mediates neurogenesis in mouse embryonic neural stem cells through the inhibition of the signal transducer and activator of transcription-3 (stat3) and the modulation of the activity of protein kinase B. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30 (2010) 909-916.
90. E. Shimizu, K. Hashimoto, N. Okamura, K. Koike, N. Komatsu, C. Kumakiri, M. Nakazato, H. Watanabe, N. Shinoda, S. Okada, M. Iyo, Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry* 54 (2003) 70-75.
91. E.A. Ogłodek, M.J. Just, A.R. Szromek, A. Araszkiwicz, Assessing the serum concentration levels of NT-4/5, GPX-1, TNF- $\alpha$ , and l-arginine as biomediators of depression severity in first depressive episode patients with and without posttraumatic stress disorder. *Pharmacol. Rep.* 69 (2017) 1049-1058.
92. J.C. Walz, P.V. Magalhães, L.M. Giglio, A.B. Cunha, L. Stertz, G.R. Fries, A.C. Andreazza, F. Kapczinski, Increased serum neurotrophin-4/5 levels in bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 43 (2009) 721-723.
93. E. Castrén, T. Rantamäki, The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action:

- Reactivation of developmental plasticity. *Dev. Neurobiol.* 70 (2010) 289-297.
94. Y. Li, B.W. Luikart, S. Birnbaum, J. Chen, C.H. Kwon, S.G. Kernie, R. Bassel-Duby, L.F. Parada, TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59 (2008) 399-412.
95. M. Tikhonova, A.V. Kulikov, Antidepressant-Like Effects of Central BDNF Administration in Mice of Antidepressant Sensitive Catalepsy (ASC) Strain. *Chin. J. Physiol.* 55 (2012) 284-293.
96. I. Khalin, R. Alyautdin, G. Kocherga, M.A. Bakar, Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *Int. J. Nanomedicine* 10 (2015) 3245-3267.
97. A. Nitta, M. Ito, H. Fukumitsu, M. Ohmiya, H. Ito, A. Sometani, H. Nomoto, Y. Furukawa, S. Furukawa, 4-methylcatechol increases brain-derived neurotrophic factor content and mRNA expression in cultured brain cells and in rat brain in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291 (1999) 1276-1283.
98. Y.Q. Liu, G.B. Su, C.H. Duan, J.H. Wang, H.M. Liu, N. Feng, Q.X. Wang, X.E. Liu, J. Zhang, Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms are associated with coronary artery disease-related depression and antidepressant response. *Mol. Med. Rep.* 10 (2014) 3247-3253.
99. R. Colle, F. Gressier, C. Verstuyft, E. Deflesselle, J.P. Lépine, F. Ferreri, P. Hardy, J.P. Guilloux, A.C. Petit, B. Fève, B. Falissard, L. Becquemont, E. Corruble, Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and 6-month antidepressant remission in depressed Caucasian patients. *J. Affect. Disord.* 175 (2016) 233-240.
100. M.F. Egan, M. Kojima, J.H. Callicott, T.E. Goldberg, B.S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, D.R. Weinberger, The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112 (2003) 257-269.

101. G. Gartlehner, K. Thaler, S. Hill, R.A. Hansen, How should primary care doctors select which antidepressants to administer? *Curr. Psychiatry Rep.* 14 (2012) 360-369.
102. P. Jaisamut, K. Wiwattanawongsa, R. Wiwattanapatapee, A Novel Self-Microemulsifying System for the Simultaneous Delivery and Enhanced Oral Absorption of Curcumin and Resveratrol. *Planta Med.* 83(2016) 461-467.
103. P. Qiu, S. Man, J. Li, J. Liu, L. Zhang, P. Yu, W. Gao, Overdose Intake of Curcumin Initiates the Unbalanced State of Bodies. *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 2765-2771.
104. J. Fan, I.A. de Lannoy, Pharmacokinetics. *Biochem. Pharmacol.* 87 (2014) 93-120.
105. T. Takarada, N. Nakamichi, R. Nakazato, T. Kakuda, H. Kokubo, S. Ikeno, S. Nakamura, N. Kuramoto, E. Hinoi, Y. Yoneda, Possible activation by the green tea amino acid theanine of mammalian target of rapamycin signaling in undifferentiated neural progenitor cells in vitro. *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (2016) 89-95.
106. Y. Yoneda, An L-Glutamine Transporter Isoform for Neurogenesis Facilitated by L-Theanine. *Neurochem. Res.* 42 (2017) 2686-2697.
107. S. Hidese, M. Ota, C. Wakabayashi, T. Noda, H. Ozawa, T. Okubo, H. Kunugi, Effects of chronic l-theanine administration in patients with major depressive disorder: an open-label study. *Acta Neuropsychiatr.* 29 (2017) 72-79.
108. M.S. Ritsner, C. Miodownik, Y. Ratner, T. Shleifer, M. Mar, L. Pintov, V. Lerner, L-theanine relieves positive, activation, and anxiety symptoms in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-center study. *J. Clin. Psychiatry* 72 (2011) 34-42.



109. K. Nasu-Tada, S. Koizumi, K. Inoue, Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia* 52 (2005) 98-107.
110. M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, A. Mizokoshi, S. Kohsaka, M.W. Salter, K. Inoue, P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424 (2003) 778-783.
111. A. Polito, J.P. Brouland, R. Porcher, R. Sonnevile, S. Siami, R.D. Stevens, C. Guidoux, V. Maxime, G.L. de la Grandmaison, F.C. Chrétien, F. Gray, D. Annane, T. Sharshar, Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock. *Crit. Care* 15 (2011) R131.
112. T. Terashima, H. Kojima, H. Urabe, I. Yamakawa, N. Ogawa, H. Kawai, L. Chan, H. Maegawa, Stem cell factor-activated bone marrow ameliorates amyotrophic lateral sclerosis by promoting protective microglial migration. *J. Neurosci. Res.* 92 (2014) 856-869.
113. C.J. Gibson, M.M. Hossain, J.R. Richardson, L.M. Aleksunes, Inflammatory Regulation of ATP Binding Cassette Efflux Transporter Expression and Function in Microglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2012) 650-660.
114. L. Qin, Y. Liu, J.S. Hong, F.T. Crews, NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia* 61 (2013) 855-868.
115. J. Saura, J.M. Tusell, J. Serratosa, High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44 (2003) 183-189.
116. R. Nakazato, T. Takarada, T. Yamamoto, S. Hotta, E. Hinoi, Y. Yoneda, Selective upregulation of Per1 mRNA expression by ATP through activation of P2X7 purinergic receptors expressed in microglial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 116 (2011) 350-361.

117. M. Yoneyama, K. Kawada, Y. Gotoh, T. Shiba, K. Ogita, Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.* 56 (2010) 740-746.
118. S.Y. Wu, Y.W. Chen, S.F. Tsai, S.N. Wu, Y.H. Shih, Y.F. Jiang-Shieh, T.T. Yang, Y.M. Kuo, Estrogen ameliorates microglial activation by inhibiting the Kir2.1 inward-rectifier K(+) channel. *Sci. Rep.* 6 (2016) 22864.
119. D.M. Wilcock, J. Hurban, A.M. Helman, T.L. Sudduth, K.L. McCarty, T.L. Beckett, J.C. Ferrell, M.P. Murphy, E.L. Abner, F.A. Schmitt, E. Head, Down syndrome individuals with Alzheimer's disease have a distinct neuroinflammatory phenotype compared to sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 36 (2015) 2468-2474.
120. R. von Bernhardi, L. Eugénin-von Bernhardi, J. Eugénin, Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 7 (2015) 124.
121. M.T. Heneka, M.P. Kummer, E. Latz, Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 463-477.
122. K. Saijo, A. Crotti, C.K. Glass, Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia* 61 (2013) 104-111.
123. L.J. Van Eldik, M.C. Carrillo, P.E. Cole, D. Feuerbach, B.D. Greenberg, J.A. Hendrix, M. Kennedy, N. Kozauer, R.A. Margolin, J.L. Molinuevo, R. Mueller, R.M. Ransohoff, D.M. Wilcock, L. Bain, K. Bales, The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (N. Y.)* 2 (2016) 99-109.
124. Y. Chao, S.C. Wong, E.K. Tan, Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed. Res. Int.* (2014) 308654.

125. A.D. Bachstetter, L.J. Van Eldik, F.A. Schmitt, J.H. Neltner, E.T. Ighodaro, S.J. Webster, E. Patel, E.L. Abner, R.J. Kryscio, P.T. Nelson, Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol. Commun.* 3 (2015) 32.
126. M.L. Block, L. Zecca, J.S. Hong, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 57-69.
127. D. Gomez-Nicola, V.H. Perry, Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist* 21 (2015) 169-184.
128. R. Fan, F. Xu, M.L. Previti, J. Davis, A.M. Grande, J.K. Robinson, W.E. Van Nostrand, Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.* 27 (2007) 3057-3063.
129. T. Yoshizaki, S. Schenk, T. Imamura, J.L. Babendure, N. Sonoda, E.J. Bae, D.Y. Oh, M. Lu, J.C. Milne, C. Westphal, G. Bandyopadhyay, J.M. Olefsky, SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E419-428.
130. S.A. Shah, M. Khan, M.H. Jo, M.G. Jo, F.U. Amin, M.O. Kim, Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. *C.N.S. Neurosci. Ther.* 23 (2017) 33-44.
131. N. D'Onofrio, L. Servillo, A. Giovane, R. Casale, M. Vitiello, R. Marfella, G. Paolisso, M.L. Balestrieri, Ergothioneine oxidation in the protection against high-glucose induced endothelial senescence: Involvement of SIRT1 and SIRT6. *Free Radic. Biol. Med.* 96 (2016) 211-222.
132. Y. Ishihara, T. Takemoto, K. Itoh, A. Ishida, T. Yamazaki, Dual role of superoxide dismutase 2 induced in

- activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses. *Biol. Chem.* 290 (2015) 22805-22817.
133. L. Pochini, M. Scalise, S. Di Silvestre, S. Belviso, A. Pandolfi, A. Arduini, M. Bonomini, C. Indiveri, Acetylcholine and acetylcarnitine transport in peritoneum: Role of the SLC22A4 (OCTN1) transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2016) 653-660.
134. Q. Zhang, Y. Lu, H. Bian, L. Guo, H. Zhu, Activation of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2. *Am. J. Transl. Res.* 9 (2017) 971-985.
135. M.H. Kim, H.J. Maeng, K.H. Yu, K.R. Lee, T. Tsuruo, D.D. Kim, C.K. Shim, S.J. Chung, Evidence of carrier-mediated transport in the penetration of donepezil into the rat brain. *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1548-1566.
136. Y. Kawasaki, Y. Kato, Y. Sai, A. Tsuji, Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2920-2926.
137. T.J. Urban, C. Yang, L.L. Lagpacan, C. Brown, R.A. Castro, T.R. Taylor, C.C. Huang, D. Stryke, S.J. Johns, M. Kawamoto, E.J. Carlson, T.E. Ferrin, E.G. Burchard, K.M. Giacomini, Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4). *Pharmacogenet. Genomics* 17 (2007) 773-782.
138. T.J. Urban, C. Brown, R.A. Castro, N. Shah, R. Mercer, Y. Huang, C.M. Brett, E.G. Burchard, K.M. Giacomini, Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83 (2008) 416-421.
139. A. Futatsugi, Y. Masuo, S. Kawabata, N. Nakamichi, Y. Kato, L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (2016) 1160-1169.

## 謝辞

本研究に関して、種々の有益な御指導と御助言ならびに御協力戴きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 加藤 将夫 教授に厚く感謝の意を表します。

また、本研究に関して、終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 中道 範隆 准教授に謹んで謝意を表します。

さらに、本研究に関して、御指導と御助言を戴きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 増尾 友佑 助教に深く感謝の意を表します。

また、本研究に関して、ご指導を頂きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）荒川 大 助教に感謝致します。

また、日々の研究生活において、有益な討論を行って頂きました分子薬物治療学研究室の諸氏に感謝致します。さらに、研究を滞りなく遂行できるよう御協力頂いた石田 利佳 技術員に感謝致します。

そして、本研究に関わる実験の遂行のために用いた数多くの動物たちに深く感謝するとともに、御冥福をお祈り致します。

最後に、有意義な学生生活を送る上で経済的、精神的に支えて戴いた両親並びに兄姉に深く感謝致します。

## 参考文献

### 主論文

**Takahiro Ishimoto**, Noritaka Nakamichi, Hikari Nishijima, Yusuke Masuo, Yukio Kato. Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1 Negatively Regulates Activation in Murine Cultured Microglial Cells. *Neurochem. Res.*, 43: 116-128, 2018 Jan.

### 副論文

**Takahiro Ishimoto**, Noritaka Nakamichi, Hiroshi Hosotani, Yusuke Masuo, Tomoko Sugiura, Yukio Kato. Organic cation transporter-mediated ergothioneine uptake in mouse neural progenitor cells suppresses proliferation and promotes differentiation into neurons. *PLoS One*, 9: e89434, 2014 Feb.

Noritaka Nakamichi, Keigo Nakayama, **Takahiro Ishimoto**, Yusuke Masuo, Tomohiko Wakayama, Hirotaka Sekiguchi, Keita Sutoh, Koji Usumi, Shoichi Iseki and Yukio Kato. Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice. *Brain and Behavior*, 6: e00477, 2016 Apr.