

課題番号 44

In vitro と *In vivo* における天然物由来 A β 凝集抑制物質の探索

[1] 組織

代表者：橋本 道男

(島根大学医学部)

対応者：荒井 啓行

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：シャハダト・ホサイン

(ジャハンギナガル大学)

片倉 賢紀

(島根大学医学部)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

アルツハイマー病 (AD) などの認知症の病態を理解するためのアミロイド仮説は、現在最も広く受け入れられている。アミロイド仮説とは、アミロイド β 蛋白質 (A β) が凝集・蓄積することで毒性を獲得し、神経細胞死を引き起こすというものである。A β の凝集・蓄積を抑制する A β 凝集抑制剤は、AD そのものの制圧を可能にすると考えられている。我々の研究グループは AD の予防や早期治療を行う目的として、天然物由来の化合物を用いてその効果を検証してきた。これまでに、多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸や緑茶の主成分のカテキン類による AD 予防・治療効果があることを脳室内に A β を注入したラットを用いて明らかにした。また、一分子蛍光分析システム、電子顕微鏡や培養細胞を用いた *in vitro* においてドコサヘキサエン酸は A β の凝集を抑制することを明らかにした。本研究は、天然由来の物質による A β 凝集抑制作用を一分子蛍光分析システム、電子顕微鏡や培養細胞を用いた *in vitro* で検証後に AD モデルラットを用いて *in vivo* でも検証することを目的とした。

以下研究活動の概要を記す。

研究の打ち合わせは、平成24年10月25日(つくば)、

平成25年1月29日(出雲)と計2回行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Centella asiatica は、東南アジアで古くから使用されている植物で、その中に含まれているテルペノイド化合物の *madecassoside* や *asiaticoside* は、酸化・抗炎症作用を持つ。本年度は、これらの化合物を用いて以下の検討を行った。

第1に、*madecassoside* と *asiaticoside* の A β 凝集抑制作用を蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いて検討した。ThT は、凝集した A β と結合すると 490 nm 付近に蛍光を発する。A β_{1-42} 溶液を 37°C で 24 時間加温後に ThT を混合し蛍光を測定した。その際、*madecassoside* と *asiaticoside* を添加して加温し、それぞれの蛍光強度を比較した。*madecassoside* と *asiaticoside* は濃度依存的に ThT 蛍光強度を最大で約 40% 減少させた。

第2に、一分子蛍光分析システム (FCS、Olympus MF20) を用いて *madecassoside* と *asiaticoside* による A β_{1-42} 凝集抑制作用を検討した。FCS は、蛍光標識した分子の並進拡散時間を測定することでその分子の大きさを高感度に測定することが可能であり、A β_{1-42} の凝集度を計測できる。A β_{1-42} の凝集が進むと分子は大きくなるために、並進拡散時間は増加する。*madecassoside* と *asiaticoside* は濃度依存的に並進拡散時間を最大で約 35% と 20% 減少させた。並進拡散時間は単量体の蛍光標識 A β_{1-42} では $105 \pm 2 \mu\text{s}$ 、凝集後の試料では $208 \pm 4 \mu\text{s}$ であった。しかし、*madecassoside* 添加時には $141 \pm 2 \mu\text{s}$ 、*asiaticoside* 添加時には $164 \pm 8 \mu\text{s}$ と減少した。

最後に、FCS 実験後の試料の一部を電子顕微鏡 (Hitachi H-7000) で観察した。*madecassoside* と *asiaticoside* は A β_{1-42} 凝集を抑制していた。

(3-2) 波及効果と発展性など

現在 AD モデルラットを用いた認知機能に対する

madecassoside の効果を検討中であり、本研究の結果を *in vivo* でも検証している。

本研究で用いた手法は、 $A\beta$ 凝集抑制作用をもつ天然物由来物質のスクリーニング系として利用できる。

[4] 成果資料

論文の投稿準備中である。しかし、以下に本研究に関連した学会発表を行った。

(1) Shahdat Hossain, Hashimoto Michio, Katakura Masanori, Shido Osamu. Asiaticoside and madecassoside, two major glycosides of *Centella asiatica* inhibit the *in vitro* amyloid beta peptide $A\beta_{1-42}$ fibrillation -assessed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, a technique capable of detecting single molecular movements and interactions in solution. The 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2013) Florence, Italy, March 6-10, 2013