

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

(島根大学医学部環境生理学)

対応者：荒井 啓行

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：片倉 賢紀(島根大学医学部環境生理学)

Abdullah Al Mamun (同上)

Hossain Shahdat (ジャハンギナガル大学、
バングラデシュ)

紫藤 治(島根大学医学部環境生理学)

研究費：物件費 20 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。昨年度は、東南アジアで古くから使用されている植物 *Centella Asiatica* に含まれるテルペノイド化合物の madecassoside や asiaticoside には *in vitro* で A β の凝集を抑制することを明らかにした。本年度の目的は、madecassoside の *in vivo* での効果を検討することであった。研究の概要は図 1 に示した。*Centella Asiatica* から精製した madecassoside を使用した。AD モデルラットとヒト神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y を用いて A β_{1-42} 細胞障害に対する効果を検討した。

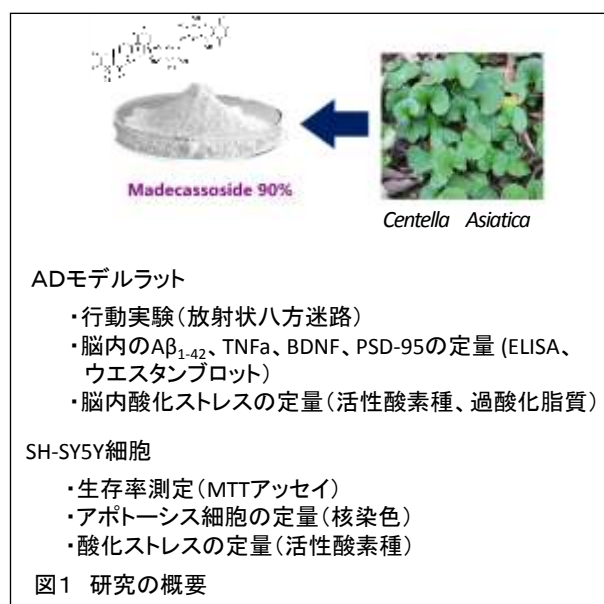
以下研究活動の概要を記す。

研究の打ち合わせは、平成 25 年 11 月 8 日 (松本市) に行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。



第1に、AD モデルラットに対する madecassoside の予防効果を検討した。Wistar 系雄性ラットを 2 群に分け、Control 群には滅菌水を、madecassoside 群には滅菌水に溶解した madecassoside (300 mg/kg 体重) を実験終了まで投与した。投与開始 4 週間後、各群をそれぞれさらに 2 群に分け片方の群には溶媒のみをもう一方には A β_{1-42} (2.5 nmol) を単回脳室内に投与した。1 週間の回復期間後に、放射状八方迷路を用いて記憶・学習能を測定した。A β_{1-42} 注入により長期記憶の指標となる参照記憶エラー数がコントロール群と比較して有意に増加した。しかし、madecassoside を前投与した群では参照記憶エラー数が有意に低下した。この結果は、A β_{1-42} 注入による記憶学習障害は madecassoside の前投与により抑制されることを示唆している。また、海馬の不溶性画分に存在する A β_{1-42} 量、炎症性サイトカイン TNF α 、過酸化脂質量、活性酸素種 (ROS) 量は madecassoside の前投与により有意に低かった。さらに、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、シナプス後肥厚部タンパク質 95 (PSD-95) のタンパク質量は madecassoside の前投与により有意に増加していた。以上の結果から、madecassoside は A β_{1-42} の脳内への蓄積を抑制するば

かりでなく、BDNFを増加させることにより脳のシナプスの形成を促進させ、記憶・学習能を高めることが明らかとなった。

第2に、ヒト神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y を用いて A β ₁₋₄₂ 誘発細胞死に対する madecassoside の抑制効果を検討した。SH-SY5Y の生存率は A β ₁₋₄₂ を添加により濃度依存的 (1-20 μ M) にコントロールと比較して最大 40% まで低下した。この低下は madecassoside の前処理によって濃度依存的 (30-100 μ M) に抑制され、コントロールの約 80% まで回復した。また、処置後の細胞をバラホルムアルデヒドで固定し、軸索を抗 Tuj-1 抗体にて染色した。その結果、A β ₁₋₄₂ 処置により、軸索の縮小・断片化を認めた。さらに、処置後の核の染色像から A β ₁₋₄₂ の添加によりアポトーシスに特徴的な核の凝集が認められた。軸索の縮小、核の凝集も madecassoside の前処理によって濃度依存的に減少した。現在、madecassoside による A β ₁₋₄₂ 誘発アポトーシス抑制作用の詳細を検討中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

昨年度のスクリーニングにより A β 凝集抑制作用を見出した madecassoside は、*In vivo* においても効果を示すことが明らかとなった。今後は新規化合物の A β 凝集抑制作用をスクリーニングし、評価する系の一つとして本研究の手法を利用できる。

AD は健康長寿を実現するために克服しなければならない疾患の一つである。本研究のようなスクリーニング系を確立できたことにより、本研究は日本のみならず世界各地に眠る未知の新規 AD 治療・予防薬の開発にも役立つと考えられる。

[4] 成果資料

以下に示す論文の投稿準備中である。

(1) Abdullah A. Mamun, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Kentaro Matsuzaki, Shahdat Hossain, Hiroyuki Arai, Osamu Shido. Neuroprotective effect of madecassoside evaluated using amyloid β ₁₋₄₂-mediated in vitro and in vivo Alzheimer's disease models.

また、以下に本研究に関連した学会発表を行った。

(1) Abdullah Al Mamun, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Kentaro Matsuzaki, Shahdat Hossain, Osamu Shido. Neuroprotective effect of madecassoside: Evaluated in amyloid β ₁₋₄₂-infused Alzheimer's disease model rats. Second Annual Conference International Chemical Biology Society (ICBS2013) Kyoto, Japan, 7-9 October, 2013.