

## Madecassoside によるラット海馬神経新生促進作用

### [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 (島根大学医学部環境生理学)

紫藤 治 (島根大学医学部環境生理学)

研究費：30 万円

### [2] 研究経過

Madecassoside (MD) はセリ科のツボクサ (Centella Asiatica) の葉に含まれる主要なトリテルペノイド化合物であり、主なる機能性として抗酸化作用・抗炎症作用を有する。応募者らはこれまで MD のアルツハイマー病 (AD) 治療薬としての可能性を検証してきた。その結果、MD は、1) チオフラビンT 蛍光法・電子顕微鏡での観察により、A $\beta$  の凝集を抑制することを確認し、2) A $\beta$  誘発ヒト神経芽細胞腫由来 SHSY-5Y 細胞毒性に対する MD の抑制効果を明らかにし、3) A $\beta$  脳室内注入により作成した AD デルラットを用いて、MD の AD に対する効果を実証し、その作用機序として、4) 海馬の脳由来栄養因子 (BDNF) と postsynaptic density protein 95 タンパク質量の増加作用と、A $\beta$  量、酸化ストレスならびに炎症マーカーの減少作用を明らかにした。これらの結果から、MD は A $\beta$  凝集の抑制作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用や抗酸化作用を介して A $\beta$  により誘発されるに認知機能障害を抑制することが明らかとなった。また正常ラットに MD を投与すると、空間認知機能が向上することも明らかとなった。しかし、詳細な機序は明らかではない。近年、空間認知機能の向上に海馬の神経新生の促進が関与していることが明らかになりつつある。そこで本研究では、MD は脳内の神経新生を促進し、空間認知機能が促進されるのではないかと仮説を検証する。

### [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。

まず第1に、神経幹細胞に対する MD の効果を検証した。増殖条件下で神経幹細胞に異なる濃度の MD を添加したところ、5  $\mu$ M 添加で生存率が増加する傾向にあった。しかし、30  $\mu$ M 添加時には生存率は減少した。分化条件下で MD を添加し、3日間培養後に行った免疫染色の結果から、Tuj-1 陽性細胞数の全細胞数に対する割合が増加していた (図1)。この結果から MD は神経幹細胞からニューロンへの分化を促進させる効果があったことが示された。

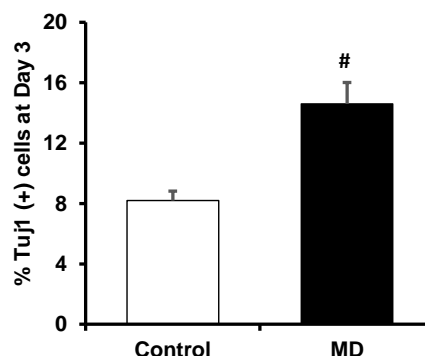


図1. 神経幹細胞の分化に対する MD の効果  
平均値  $\pm$  標準偏差 (n=3). #, student t-test (P<0.05).

第2に、ニゲラサチバの種子油に含まれるチモキノン (TQ) による A $\beta$  凝集抑制効果を検討した。試験管内で A $\beta$  を凝集させるときに TQ を添加し、一定時間加温した。加温後、一部を取りだし、チロシンの蛍光強度を測定した結果、TQ の添加により蛍光強度が有意に低下した。また、電子顕微鏡下で反応液を観察したところ、TQ の添加により A $\beta$  の凝集が抑制されていた。さらに、一分子蛍光分析装置 (Fluoro Point Light (オリンパス)) を用いて並進拡散時間を測定した。並進拡散時間は TQ 濃度依存的に低下した。この時間は凝集体の大きさと反比例するため、時間が低下したことは、凝集が抑制されたことを示している。

第3に、TQ によるラット海馬神経新生に対する効果を検証した。ラットに TQ (25 mg/kg/day) を4週間経口投与した。投与開始から5日間は腹腔内にブロモデオキシウリジン (BrdU, 50 mg/kg/day) を

投与した。BrdU は新生細胞の核に取り込まれる試薬で、脳内では神経幹細胞が増殖する際に細胞内に取り込まれる。その後、BrdU 標識された細胞の脳内で分化し、様々な細胞となる。4週間 TQ 投与後、パラホルムアルデヒドで還流固定後、脳を摘出し、凍結切片を作成した。脳切片を免疫染色し BrdU 陽性細胞数を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。海馬歯状回の BrdU 陽性細胞数は TQ 投与により有意に増加した。また、新生ニューロンマーカー doublecortin (DCX) と BrdU 二重陽性細胞の割合も TQ 投与により有意に増加した (図2)。以上の結果から TQ にも神経新生促進作用があることが明らかとなった。

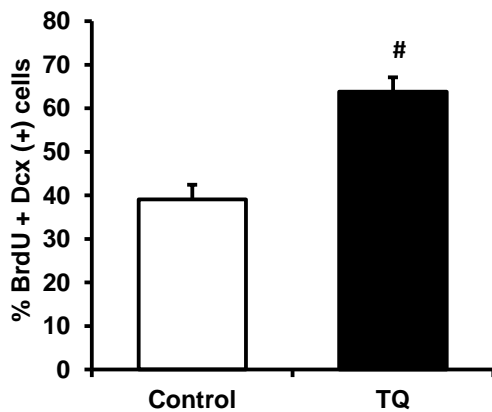


図2. ラット海馬歯状回の神経幹細胞のニューロンへの分化に対する TQ の効果  
平均値 ± 標準偏差 (n=3). #, student t-test (P<0.05).

### (3-2) 波及効果と発展性など

高齢化社会の中にある日本にとって認知症は早急に克服しなければならない疾患の一つである。現在認知症の発症を遅延させたり、症状を緩和させたりする試みがなされているが、依然として患者数は増え続けている。我々はこれまでに様々な天然物による認知症予防・改善効果の可能性を検討してきた。その中で、効率的に候補物質をスクリーニングするための試験管レベル、神経幹細胞に対する検討方法を確立した。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

論文

1) Abdullah Al Mamun, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Shahdat Hossain, Osamu Shido. Neuroprotective effect of thymoquinone