

氏 名 (生年月日) ふくだ あい な  
福田 愛 菜 (1992 年 12 月 27 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 226 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 アルツハイマー病の早期診断と治療への応用を指向した生薬由来成分  
plantainoside B のアミロイド  $\beta$  への結合性と神経保護作用の研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 高 田 和 幸

(副査) 教 授 藤 室 雅 弘

(副査) 教 授 安 井 裕 之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

少子高齢化が進むなか、加齢を最大の発症リスクとするアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の罹患率は増加の一途をたどる。しかし、現在の AD 治療は薬物療法を含めて対症療法であり、発症機序に根差したより根本的な治療法の開発が課題となっている。AD の病態形成機序に関して、アミロイド  $\beta$  (amyloid  $\beta$ ; A $\beta$ ) の低分子量複合体 (オリゴマー) が強い神経毒性を示し、AD 発症を招くとするオリゴマー仮説が提唱されている。また、記憶形成に関わり大脳全域に投射するアセチルコリン (acetylcholine; ACh) 作動性神経 (ACh 神経) は AD の早期から脱落しており、脳内アセチルコリンの欠乏が AD 発症の一端を担うとするコリン仮説も提唱されている。しかし、極めて高い凝集性を示す A $\beta$  を用いた解析は難しく、また、研究対象としてのヒト ACh 神経の入手は困難であることから、これらの仮説に基づく AD 発症機序の詳細は未だ不明である。本研究では、凝集開始点の制御により安定したオリゴマー形成が可能な 26-*O*-acyl isoA $\beta$ <sub>1-42</sub> (isoA $\beta$ ) と、ヒト人工多能性幹 (human induced pluripotent stem; hiPS) 細胞から分化誘導した ACh 神経を用い、オリゴマー仮説やコリン仮説を考慮したヒト培養細胞系での神経障害モデルを構築し、A $\beta$  オリゴマーによる神経障害について解析した。さらに、A $\beta$  凝集体に結合する低分子化合物を生薬抽出エキスを探索し、神経保護作用ならびに放射性同位元素標識体による脳内 A $\beta$  の検出について解析した。

### 1) A $\beta$ オリゴマー仮説およびコリン仮説の証明を目指したヒト ACh 神経障害モデルの構築と A $\beta$ オリゴマーによる神経障害機序の解析

分子構造内に *O*-acyl 結合を有する isoA $\beta$  は、酸性条件下では凝集せず単量体として存在するが、中性条件下で *O*-acyl 結合はアミド結合となり、isoA $\beta$  は元来の A $\beta$  の一次構造となって凝集を開始する。この isoA $\beta$  の中性条件下での経時的な凝集を解析したところ、単量体から A $\beta$  オリゴマーを経て高分子量複合体 (フィブリル) を形成した。各凝集時点における A $\beta$  をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に処置したところ、A $\beta$  オリゴマーが豊富に存在する条件下では顕著な細胞障害が検出され、フィブリル形成が進むと細胞障害は減弱した。共焦点レーザー顕微鏡により培養細胞と A $\beta$  との空間的局在を解

析したところ、事前に凝集させた A $\beta$  フィブрилを処置した場合と比較して、事前凝集過程を経ない A $\beta$  の処置では細胞表面の A $\beta$  接着領域が約 35%増加した。このことから、A $\beta$  オリゴマーによる細胞接着はフィブрилよりも強く、細胞障害に深く関与することが示唆された。次に、コリン仮説を考慮した AD 病態を細胞培養系で再現することを目的として、hiPS 細胞から ACh 神経への分化誘導方法を検討した。Dual SMAD 阻害法により神経外胚葉系への分化誘導を進め、脳の前後軸および背腹軸の空間的座標についてはそれぞれ Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路の阻害剤である XAV939 と sonic hedgehog シグナル経路の活性化剤である purmorphamine を用いて調節した。その結果、分化誘導 24 日目において、アセチルコリン合成酵素を発現する細胞が全細胞の約 86%となり、高い純度で ACh 神経を分化誘導することができた。このヒト ACh 神経細胞に isoA $\beta$  を処置したところ、樹状突起を含むヒト ACh 神経の表面に A $\beta$  が接着し、細胞障害が誘導された。以上より、A $\beta$  オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルの構築に成功し、この神経障害には A $\beta$  の細胞表面接着が関与することを見出した。

## 2) *Bacopa monniera*抽出エキスをを用いた A $\beta$ 結合性低分子化合物の探索およびその神経保護作用の解析と放射性同位元素標識体による A $\beta$ の検出

isoA $\beta$  から作製した A $\beta$  凝集体を結合させたセファロースビーズを用い、先行研究で AD モデルマウス脳内の A $\beta$  量を減少させることが報告されているハーブ *Bacopa monniera* の全草抽出エキスから A $\beta$  凝集体に結合する低分子化合物を探索したところ、plantainoside B を同定した。第 1 章で構築した A $\beta$  オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルを用いた解析により、plantainoside B が A $\beta$  の細胞表面への接着を減弱させて神経保護作用を示すことがわかった。さらに、plantainoside B は isoA $\beta$  処置による細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入およびミトコンドリア膜電位の低下を有意に抑制した。無細胞系にて A $\beta$  の凝集に対する plantainoside B の作用を解析したところ、thioflavin T、原子間力顕微鏡ならびにウェスタンブロッティング法による解析において、plantainoside B は顕著な A $\beta$  凝集抑制作用を示した。一方、放射性同位元素 <sup>125</sup>I を標識した plantainoside B を A $\beta$  凝集体と混合して blue native ポリアクリルアミドゲルで展開したところ、5~60 量体の A $\beta$  凝集体や A $\beta$  フィブрилが存在する位置に強い放射能が検出された。また、脳内 A $\beta$  蓄積を示す AD モデルマウスの脳切片に <sup>125</sup>I 標識 plantainoside B を処置した結果、野生型マウスと比べ強い放射能が検出された。最後に、新規物体認識試験にて野生型マウスの認知機能を解析したところ、海馬内への isoA $\beta$  投与により認知機能が低下し、plantainoside B はその低下を抑制することがわかった。以上より、plantainoside B は A $\beta$  フィブрилを主体にオリゴマーにも結合し、A $\beta$  の凝集や細胞表面への接着を抑制してヒト ACh 神経を保護すること、さらに、A $\beta$  投与により誘導されたマウスの認知機能障害を改善することが示唆された。また、plantainoside B は脳切片でも A $\beta$  凝集体に結合することが示唆された。

## 総括

本研究では、オリゴマー仮説やコリン仮説の証明を目指した A $\beta$  オリゴマー誘発ヒト ACh 神経障害モデルを構築し、その機序として A $\beta$  の細胞表面接着、細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入ならびにミトコンドリア膜電位低下の関与を見出した。また、plantainoside B の A $\beta$  フィブрилを主としたオリゴマーへの結合性、A $\beta$  の凝集や細胞表面への接着抑制による神経保護作用、ならびに isoA $\beta$  投与によるマウスの認知機能障害に対する改善作用が示され、<sup>125</sup>I 標識 plantainoside B は脳切片でも A $\beta$  を検出できることがわかった。AD の早期発見・早期治療の重要性が認識されるなか、本研究は、診断 (A $\beta$  蓄積の検出) と治療 (神経細胞保護) を同時に担う AD に対する theranostics 開発の可能性を示唆しており、その基盤形成の一助となることが期待される。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

超高齢化社会を迎えて社会問題に発展するアルツハイマー病において、予防や効果的治療に向けた早期診断と早期治療の重要性が指摘されている。アルツハイマー病の発症機序は不明であるが、アミロイド  $\beta$  オリゴマー ( $A\beta$  オリゴマー) の神経毒性との関連が注目されており、また、前脳基底部から投射するコリン作動性神経の脱落は認知機能低下に直結する病理学的所見として認識されている。本研究では、脳内  $A\beta$  オリゴマーの検出とその毒性から神経細胞を保護するための手がかりを得るため、生薬成分から  $A\beta$  オリゴマーに結合する低分子化合物を探索し、神経保護作用と  $A\beta$  オリゴマー検出プローブとしての有用性を評価した。

### 《審査結果の要旨》

第 1 章では、アルツハイマー病病態をより適切に再現する神経障害モデル系を構築するため、 $A\beta$  オリゴマーによって神経毒性を誘発する方法と、ヒト人工多能性幹 (hiPS) 細胞からコリン作動性神経への分化誘導条件を検討した。酸性条件下では凝集せず中性条件下で凝集を開始する iso $A\beta$  を用いたところ、 $A\beta$  オリゴマーが安定的に形成される時間枠を見出し、その間において細胞障害が誘導されることを示した。また、 $A\beta$  オリゴマーの細胞表面への接着が細胞障害に深く関与することも示唆した。一方、種々の化合物を用いて前脳基底部の発生環境を再現し、hiPS 細胞からコリン作動性神経の分化誘導に成功した。さらに、iso $A\beta$  と組み合わせることで、 $A\beta$  オリゴマー誘発コリン作動性神経障害モデルの構築に成功した。

第 2 章では、生薬成分から  $A\beta$  オリゴマーへの結合性を有する低分子化合物を探索し、神経保護作用と  $A\beta$  オリゴマーの検出能について解析した。生薬として脳内アミロイド  $\beta$  の減少効果が報告されている *Bacopa monniera* を用い、神経保護作用の解析には第 1 章で構築した  $A\beta$  オリゴマー誘発コリン作動性神経障害モデルを用いた。また、 $A\beta$  オリゴマーの検出については放射性同位元素を用いた解析を実施した。その結果、*Bacopa monniera* 成分中からアミロイド  $\beta$  フィブリルとともにそのオリゴマーにも結合し、アミロイド  $\beta$  凝集を顕著に抑制する plantainoside B を見出し、コリン作動性神経に対する保護作用を示した。また、plantainoside B の神経保護機序として、アミロイド  $\beta$  の細胞表面への接着抑制作用、 $Ca^{2+}$  過剰流入やミトコンドリア膜電位異常の抑制作用を示唆した。さらに、野生型マウスに iso $A\beta$  を脳内投与することで誘発される認知機能低下に対し、plantainoside B が抑制的に働くことも示した。また、アルツハイマー病モデルマウスの脳切片に  $^{125}I$  標識 plantainoside B を処置したところ、野生型マウスに比べて強い放射活性が検出されたことから、脳内  $A\beta$  オリゴマーの検出プローブとしての可能性を示した。

### 《審査の結論》

本研究では、アルツハイマー病の脳病態をより適切に再現する hiPS 細胞由来コリン作動性神経障害モデルを構築し、 $A\beta$  オリゴマーの毒性機序についてアミロイド  $\beta$  の細胞表面接着、細胞内  $Ca^{2+}$  過剰流入やミトコンドリア膜電位低下の関与を示した。また、生薬成分からアミロイド  $\beta$  フィブリルとともにオリゴマーへの結合性を示す plantainoside B を見出し、 $A\beta$  オリゴマー誘発コリン作動性神経障害やマウス認知機能低下に対する抑制作用を示した。さらに、放射性同位元素を標識した plantainoside B による脳切片上でのアミロイド  $\beta$  検出能を示した。本研究における成果は、アルツハイマー病の早期発見と早期治療を同時に実現する方策についての有用な基礎的知見を提供するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。